

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Lehrstuhl: Bakteriologie

Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Rainer Haas

Charakterisierung neuer Adhäsinsrezeptoren von  
*Helicobacter pylori* und deren Rolle bei der Translokation  
des Cytotoxins CagA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Lea Charlotte Holsten**

aus Datteln

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Rainer Haas

Zweitgutachterin: Priv. Doz. Dr. Ingrid Boeckhoff

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.20215

# Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lea Charlotte Holsten, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Charakterisierung neuer Adhäsinsrezeptoren von *Helicobacter pylori* und deren Rolle bei der Translokation des Cytotoxins CagA“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht unter folgendem Titel:

Königer, V.<sup>\*</sup>, Holsten, L.<sup>\*</sup>, Loell, E., Busch, B., Bonsor, D. A., Breithaupt, U., Roth, A., Kengmo-Tchoupa, A., Smith, S. I., Mueller, S., Sundberg, E. J., Zimmermann, W., Fischer, W., Hauck, C. R. und Haas, R. (in Vorbereitung): *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs for adherence and translocation of CagA.

<sup>\*</sup>Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen

Weitere Publikationen, die nicht in dieser Arbeit enthalten sind:

Rohrer, S., Holsten, L., Weiss, E., Benghezal, M., Fischer, W. und Haas, R. (2012): Multiple pathways of plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori*. PLoS One, 7, S. e45623.

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>IV. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>XII</b>
<b>VI. Summary .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Adhäsion .....	1
1.2 Zelluläre Adhäsionsmoleküle in humanen Epithelien .....	1
1.2.1 Aufbau und Funktion von Integrinen .....	2
1.2.2 Die Adhäsinfamilie der Syndecane .....	3
1.2.3 Die karzinoembryonale Antigen-Zelladhäsionsmolekül-Familie – CEACAMs.....	4
1.3 Bakterielle Adhäsionsmechanismen .....	6
1.3.1 Adhäsion von Bakterien an HS und HSPGs .....	8
1.3.2 Bakterielle Adhäsion an CEACAMs .....	9
1.4 Das humanpathogene Bakterium <i>H. pylori</i> .....	11
1.5 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i> und deren Wirkungsweisen.....	13
1.5.1 Das vakuolisierende Cytotoxin VacA.....	14
1.5.2 Der Einfluss von CagA auf Epithelzellen .....	14
1.5.3 Das Typ-4-Sekretionssystem der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel und der Translokationsmechanismus von CagA .....	17
1.6 Äußere Membranproteine von <i>H. pylori</i> und deren adhäsive Eigenschaften .....	20
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien.....	23

<b>2.2</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme und Bakterienkultivierung.....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Anzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i> Bakterien .....	23
2.2.2	Anzucht und Stammhaltung von <i>H. pylori</i> Bakterien .....	23
2.2.3	Verwendete Bakterienstämme .....	24
2.2.4	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien .....	25
<b>2.3</b>	<b>Genetische Manipulation von Bakterien.....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Transformation von <i>H. pylori</i> .....	25
2.3.2	Elektroporation von <i>H. pylori</i> (Segal und Tompkins 1993).....	26
2.3.3	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	26
2.3.4	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> (Sambrook J. 2001) .....	26
<b>2.4</b>	<b>Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung.....</b>	<b>27</b>
2.4.1	Verwendete Zelllinien.....	27
2.4.2	Kultivierung und Kryokonservierung von adhärenenten eukaryotischen Zellen.....	28
2.4.3	Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen im FibraStage™ System .....	29
2.4.4	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	30
<b>2.5</b>	<b>Transfektion von HEK-293-Zellen .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>30</b>
2.6.1	Oligonukleotide und Plasmide .....	30
2.6.2	Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i> .....	34
2.6.3	Restriktion von DNA .....	34
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.6.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und inverse PCR .....	34
2.6.6	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen.....	35
2.6.7	Ligation von DNA .....	35
2.6.8	Sequenzierung von DNA .....	36
2.6.9	<i>In silico</i> Klonierungen .....	36
<b>2.7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	36
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
2.7.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran (Western-Blot) .....	37
2.7.4	Antikörper .....	38
2.7.5	Herstellung von Bakterien- und Zelllysaten .....	40
2.7.6	Proteinfällung aus Zellkulturüberständen .....	40
2.7.7	Markierung von $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin mit einem Fluoreszenzfarbstoff.....	40
<b>2.8</b>	<b>Herstellung von CEA-N-GFP in HEK-293-Zellen (Kuespert <i>et al.</i> 2007).....</b>	<b>40</b>
<b>2.9</b>	<b>Produktion von Aufreinigung von Proteinen .....</b>	<b>41</b>
2.9.1	Heterologe Produktion der Syndecan-4 Ektodomäne .....	41

2.9.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Syndecan-4.....	41
2.9.3	Aufreinigung von $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinheterodimeren aus Zellkulturüberstand (Takagi <i>et al.</i> 2001).....	42
<b>2.10</b>	<b>Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchfluscytometrie.....</b>	<b>43</b>
<b>2.11</b>	<b>Durchfluscytometrie.....</b>	<b>43</b>
<b>2.12</b>	<b>Untersuchung der Phospholipase C-Sensitivität von CEA .....</b>	<b>44</b>
<b>2.13</b>	<b>Bestimmung der Bindung von löslichem <math>\alpha 5 \beta 1</math>-Integrinheterodimer an HEK-293-Zellen.....</b>	<b>44</b>
<b>2.14</b>	<b>Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i>.....</b>	<b>44</b>
2.14.1	Bestimmung der CagA-Translokation in eukaryotische Zellen – CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment .....	44
2.14.2	Bestimmung der Adhärenz von <i>H. pylori</i> an HEK-293-Zellen.....	45
<b>2.15</b>	<b><i>Pull-down</i>-Experimente mit <i>H. pylori</i>.....</b>	<b>45</b>
2.15.1	<i>H. pylori</i> CEA-N-GFP <i>Pull-down</i> -Experiment (Kuespert <i>et al.</i> 2007).....	45
2.15.2	<i>H. pylori</i> Syndecan <i>Pull-down</i> -Experiment .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung von <i>H. pylori</i> Adhäsinen die mit der CagA-Translokation assoziiert sind.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Die äußeren Membranproteine HopQ und SabB und deren Einfluss auf die CagA-Translokation – vorangegangene Arbeiten .....	47
3.1.2	Herstellung einer SabB/HopQ-Doppelmutante in <i>H. pylori</i> P12 und deren Auswirkung auf die CagA-Translokation.....	47
<b>3.2</b>	<b>Syndecane als potenzielle Rezeptoren von <i>H. pylori</i> .....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Einfluss von Heparin auf die CagA-Translokation .....	50
3.2.2	Untersuchung einer potenziellen Interaktion zwischen der Ektodomäne von Syndecan-4 und <i>H. pylori</i> .....	51
<b>3.3</b>	<b>Einfluss der HopQ-CEACAM Interaktion auf die CagA-Translokation in HEK-293-Zellen.....</b>	<b>53</b>
3.3.1	Potenzielle Interaktion zwischen $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und CEACAMs .....	54
3.3.2	Bestimmung der für die CagA-Translokation essenziellen CEA-Domänen .....	58
3.3.3	Ermittlung der Adhärenz von <i>H. pylori</i> an membranständiges CEA in Abhängigkeit der IgV- bzw. der IgC-Domänen .....	64
3.3.4	Antikörpervermittelte Vernetzung von adhäsionsunfähigem CEA $\Delta$ IgV .....	66
3.3.5	Einfluss einer kovalenten CEA-Dimerisierung auf die Bindung und CagA-Translokation von <i>H. pylori</i> .....	67
3.3.6	Untersuchung der Funktion der GPI-Verankerung von CEA im Hinblick auf die CagA-Translokation von <i>H. pylori</i> .....	72
3.3.7	Verifizierung der <i>H. pylori</i> -CEACAM Interaktion im zellulären Kontext .....	76

3.3.8 Die Bedeutung der Aminosäuren R43 und Q44 im CEA für eine HopQ-abhängige Bindung von <i>H. pylori</i> .....	78
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1 Adhäsine von <i>H. pylori</i> und Syndecane als potenzielle Rezeptoren .....	83
4.2 Einfluss der HopQ-CEACAM-Interaktion auf die Translokation von CagA .....	86
4.3 Die Bedeutung der Glykosylierungen und der IgC-Domänen von CEA .....	88
4.3.1 Funktion der Glykosylierungen von CEACAMs und deren Rolle für die Adhäsion von Bakterien .....	89
4.3.2 Die konstanten Domänen der CEACAM-Familie .....	90
4.4 Die durch Membranverankerung bestimmte Lokalisierung und Funktion von Proteinen .....	94
4.5 Die IgV-ähnliche Domäne von CEACAMs als Rezeptor für bakterielle Adhäsine .....	97
4.5.1 Aufbau der IgV-Domäne und Aspekte der homo- bzw. heterophilen Interaktion .....	97
4.5.2 Einblicke in die strukturellen Aspekte der bakteriellen Bindung an die IgV-Domäne von CEACAMs .....	100
4.5.3 Die Relevanz der Aminosäuren R43 und Q44 in CEA und CEACAM1 .....	104
4.6 Durch bakterielle Bindung an CEACAMs ausgelöste Signaltransduktionen .....	106
4.7 Der Zusammenhang zwischen CEACAMs und Krebs .....	108
4.8 Schlussfolgerung .....	109
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>130</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>131</b>



## II. Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	Gewichtsvolumenanteil
(w/w)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
$\alpha$	anti
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abl	Kinase, engl.: <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
AK	Antikörper
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BB	engl.: <i>Brucella Broth</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
<i>cag</i>	engl.: <i>cytotoxin-associated gene</i>
CagA-P	phosphoryliertes CagA
CAM	Zelladhäsionsmoleküle, engl.: <i>cell adhesion molecule</i>
CD	Oberflächenmarker, engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CEA	karzinoembryonales Antigen, auch CEACAM5 genannt
CEACAM	karzinoembryonale Antigen-Zelladhäsionsmoleküle, engl.: <i>carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CSK	C-terminale Src-Kinase
C-Terminus	carboxyterminaler Bereich
$\Delta$	Deletion
Da	Dalton
DAF	Protein des Komplementsystems, engl.: <i>decay accelerating factor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	PBS nach der Rezeptur von Dulbecco
ED	Ektodomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFYA	Proteinmotiv: Glutamat-Phenylalanin-Tyrosin-Alanin

EGFP	verstärktes grünfluoreszierendes Protein, engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>
engl.	englisch
EPIYA	Glutamat-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-Alanin
Erk	Kinase, engl.: <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
et al.	und andere, lat.: <i>et alii</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusscytometer zum Sortieren, engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase, engl.: <i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
G	Guanin
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
His-tag	sechs aufeinanderfolgende Histidine die als Proteinmarkierung dienen
Hof	engl.: <i>Helicobacter OMP family</i>
Hom	engl.: <i>Helicobacter outer membrane</i>
Hop	engl.: <i>H. pylori outer membrane proteins</i>
Hor	engl.: <i>Hop related proteins</i>
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykanen
Ig	Immunglobulin
IgC	konstante Ig-ähnliche Domäne
IgCAM	Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, engl.: <i>immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules</i>
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IgV	variable Ig-ähnliche Domäne, auch N-Domäne genannt
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -galactosid
ITAM	Proteinmotiv, engl.: <i>immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i>
ITIM	Proteinmotiv, engl.: <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif</i>
JAM-A	engl.: <i>junctional adhesion molecule 1</i>
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter

---

L	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
LRP1	Lipoprotein, engl.: <i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
M	Molar
m	milli
MALT	engl.: <i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MARK2	mikrotubuliaffinitätsregulierende Kinase-2, auch PAR1b genannt
mg	Milligramm
μ	mikro, 10 <sup>-6</sup>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion, engl.: <i>multiplicity of infection</i>
N	N-terminale Domäne
NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
N-Terminus	aminoterminaler Bereich eines Proteins
OD	optische Dichte
OMP	äußere Membranproteine, engl.: <i>outer membrane proteins</i>
Opa	Opazitätsproteine
Op <sub>CEA</sub>	CEACAM-bindende Opazitätsproteine
Op <sub>HS</sub>	HS-bindende Opazitätsproteine
ori	Replikationsursprung, engl.: <i>origin of replication</i>
PAGE	Polacrylamid-Gelelektrophorese, engl.: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	Proteininteraktionsdomäne
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI45P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin

RGD-Motiv	Proteinmotiv: Arginin-Glycin-Aspartat-Motiv
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SHP	Phosphatase, engl.: <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
SKF	Src-Kinasen-Familie
spp.	mehrere Spezies, <i>species pluralis</i>
Src	Kinase, auch c-Src, engl.: <i>cellular sarcoma kinase</i>
T	Thymin
T4SS	Typ-4-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
tag	Proteinmarkierung
TBS	engl.: <i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Wachstumsfaktor, engl.: <i>transforming growth factor</i>
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tub	Tubulin
U	Einheit, engl.: <i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	x-faches der Erdbeschleunigung
ZO-1	Zonula-Occludens-1-Protein

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aufbau und Konformation eines Integrindimers. ....	2
Abb. 1.2: Aufbau und Funktion von Syndecan-4. ....	4
Abb. 1.3: Übersicht über die CEACAM-Familie.....	5
Abb. 1.4 Vereinfachte Übersicht des Magen. ....	12
Abb. 1.5: Darstellung der Effekte des Cytotoxin CagA auf Epithelzellen.....	16
Abb. 1.6: Phylogenetische Einteilung der Hop- und Hor-Proteinfamilie von <i>H. pylori</i> . ....	21
Abb. 3.1: SabB/HopQ-Doppelmutation in <i>H. pylori</i> P12. ....	49
Abb. 3.2: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit Heparin. ....	50
Abb. 3.3: Pull-down-Experiment mit <i>H. pylori</i> und GST-Syndecan-4.....	51
Abb. 3.4: Heterologe Produktion und Aufreinigung der Ektodomäne von Syndecan-4. ....	52
Abb. 3.5: Pull-down-Experiment von <i>H. pylori</i> mit Syndecan-4.....	53
Abb. 3.6: Schematische Darstellung des löslichen Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Dimers.....	54
Abb. 3.7: Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen im Fibrastage-System (New Brunswick). ....	55
Abb. 3.8: HPLC-Elutionsprofil und SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen der Aufreinigung des löslichen $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimers. ....	56
Abb. 3.9: SDS-PAGE und Western-Blot der Proteolyse des $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimers. ....	57
Abb. 3.10: Bindung von löslichem inaktivierten bzw. aktivierten $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer an HEK-293- Zellen. ....	58
Abb. 3.11: Schematische Darstellung der verschiedenen CEA Verkürzungen.....	59
Abb. 3.12: Überprüfung der Produktion der verkürzten CEA-Proteine in HEK-293-Zellen.....	60
Abb. 3.13: Auswirkungen der CEA Verkürzungen auf die CagA-Translokation.....	61
Abb. 3.14: Phospholipase C (PLC) Sensitivität von CEA und CEA-HA in HEK-293-Zellen. ....	62
Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Spaltstelle für die Anheftung des GPI an den C-terminalen Bereich von CEA und CEA-HA. ....	62
Abb. 3.16: Schematische Darstellung von CEA $\Delta$ IgC bzw. CEA $\Delta$ IgV und deren Produktion in HEK- 293-Zellen.....	63
Abb. 3.17: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit CEA $\Delta$ IgC- bzw. CEA $\Delta$ IgV- produzierenden HEK-293-Zellen.....	64
Abb. 3.18: Die Adhärenz von <i>H. pylori</i> an CEA $\Delta$ IgC- und CEA $\Delta$ IgV-produzierende HEK-293- Zellen. ....	65
Abb. 3.19: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit immunglobulärer Vernetzung von CEA. ....	67
Abb. 3.20: Produktion des Dimers CEA V39C in HEK-293-Zellen und dessen Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von <i>H. pylori</i> . ....	69
Abb. 3.21: Produktion von CEA $\Delta$ IgC V39C in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA- Translokation und Adhärenz von <i>H. pylori</i> .....	70

Abb. 3.22: <i>Pull-down</i> -Experiment mit löslichen CEA-N-GFP und CEA V39C-N-GFP. ....	71
Abb. 3.23: Schematische Darstellung von CEA-N/3-TM und die Produktion in HEK-293-Zellen. ....	73
Abb. 3.24: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment und Adhäsion von <i>H. pylori</i> an CEA-N/3-TM-produzierende HEK-293-Zellen. ....	74
Abb. 3.25: Produktion von CEACAM3 in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von <i>H. pylori</i> .....	75
Abb. 3.26: Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit CEACAM1, 3, 4, 6, 7, 8 bzw. CEA. ....	77
Abb. 3.27: Aminosäuresequenzvergleich der IgV-Domänen von CEACAM1, CEA, CEACAM3 und CEACAM6. ....	78
Abb. 3.28: Produktion von CEA R43S Q44L in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von <i>H. pylori</i> .....	79
Abb. 3.29: Produktion von CEAΔIgC R43S Q44L in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von <i>H. pylori</i> . ....	81
Abb. 3.30: <i>Pull-down</i> -Experiment mit löslichen CEA-N-GFP und CEA R43S Q44L-N-GFP.....	82
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der CagA-Translokation in verschiedenen Zelllinien. ....	88
Abb. 4.2: Modelle der Cis- und Trans-Interaktion von CEACAM1 und der Trans-Bindung von CEA. ....	91
Abb. 4.3: Einfluss der IgC- bzw. IgV-Domäne auf die Translokation von CagA. ....	92
Abb. 4.4: Darstellung der durch antikörpervermittelten Signalübertragung von CEA. ....	93
Abb. 4.5: Modell der CagA-Translokation mit verschiedenen CEACAM-Rezeptoren.....	96
Abb. 4.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der IgV-Domänen von Mitgliedern der CEACAM-Familie. ....	97
Abb. 4.7: Dreidimensionale Struktur der IgV-Domäne von CEA .....	98
Abb. 4.8: Dreidimensionale Struktur des löslichen IgV-Dimers von CEA. ....	99
Abb. 4.9: Aminosäuresequenzen von CEACAM1, 3, 6 und CEA und die Lokalisierung der β-Stränge. ....	101

## IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der Komponenten des Cag-T4SS.....	18
Tab. 2: Konzentrationen der für <i>E. coli</i> verwendeten Antibiotika .....	23
Tab. 3: Konzentrationen der für <i>H. pylori</i> verwendeten Antibiotika .....	24
Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme .....	24
Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien .....	27
Tab. 6: Verwendete Zellkulturmedien, Verdünnungsfaktoren und Antibiotikakonzentrationen .....	29
Tab. 7: Fibrastage™ Programme für die Immobilisierung und das Wachstum von CHO lec 3.2.8.1- Zellen .....	30
Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide .....	31
Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	32
Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete DNA-Polymerasen und deren Anwendung .....	35
Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper .....	38
Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper .....	39
Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindung von <i>H. pylori</i> an CEACAMs. ....	105

## V. Zusammenfassung

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung sind mit dem humanpathogenen Bakterium *Helicobacter pylori* infiziert. Es ist in der Lage im Magen, dem natürlichen Habitat, erfolgreich zu persistieren und führt in den meisten Fällen zu einer asymptomatischen Gastritis. Jedoch können auch schwerere Erkrankungen wie beispielsweise Magengeschwüre und -krebs entstehen. *H. pylori* besitzt eine große Anzahl an adhäsionsvermittelnden äußeren Membranproteinen und Virulenzfaktoren. Eine entscheidende Rolle während der Infektion spielt das Cytotoxin CagA, welches durch das Cag-Typ-4-Sekretionssystem in die Wirtszellen transloziert wird. Der Transfer wird unter anderem von dem äußeren Membranprotein HopQ beeinflusst. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch ungeklärt. In dieser Arbeit sollten einerseits neue zelluläre Rezeptoren für *H. pylori* Adhäsine identifiziert und andererseits deren Einfluss auf die CagA-Translokation untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass HopQ von *H. pylori* als neuartiges Adhäsine fungiert und an membranständige Vertreter der Zelladhäsionsmoleküle der karzinoembryonalen Antigenfamilie (CEACAM) bindet. Dabei werden CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 (CEA) und CEACAM6 HopQ-abhängig erkannt. Die Bindung erfolgt an die IgV-ähnlichen Domänen von CEA und CEACAM3. Es ist anzunehmen, dass HopQ ebenfalls mit der IgV-Domäne von CEACAM1 und 6 interagiert. Darüber hinaus wird die Bindung an CEA von den Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 beeinflusst, weshalb die Interaktion von HopQ mit der IgV-Domäne in diesem Bereich vermutet wird.

Neben der Adhäsion konnte erstmals beobachtet werden, dass jeder der vier zellulären Rezeptoren die CagA-Translokation in HEK-293-Zellen unterstützt, die in Abwesenheit der Moleküle in diesen Zellen nicht möglich ist. Die Adhäsion von *H. pylori* korreliert dabei mit dem Transfer von CagA in die Zielzelle und scheint somit für diesen Vorgang notwendig. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass neben der Adhäsion per se auch andere, durch die Bindung ausgelöste Faktoren notwendig sind. Dazu wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die IgC-Domänen von CEA essenziell für die Adhäsion und die CagA-Translokation sind und ob die Zusammenlagerung von CEA (*clustering*) bzw. die Lokalisierung in *Lipid-rafts* zur CagA-Translokation beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* auch dann in der Lage ist, CagA zu übertragen, wenn die IgC-Domänen von CEA fehlen. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Bindung von HopQ an CEA kein Signal über die IgC-Domänen weitergeleitet wird, welches die Translokation ermöglicht. Die antikörpervermittelte Vernetzung von CEA-Molekülen führte zwar nachweislich zu einer Signaltransduktion, diese war aber für die CagA-Translokation nicht notwendig. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen HopQ und CEA nicht zur gleichen Signaltransduktion führt. Diese Ergebnisse erlauben



die Schlussfolgerung, dass durch die Adhäsion kein Zusammenlagern von CEA-Rezeptoren hervorgerufen wird. Des Weiteren führte der Austausch des GPI-Ankers von CEA zu einer Lokalisierung außerhalb von *Lipid-rafts*, ermöglichte aber dennoch den Transfer des Toxins in HEK-293-Zellen. Die durch CEACAMs vermittelte Übertragung von CagA ist also unabhängig von der Lokalisierung der Moleküle in *Lipid-rafts*. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Mechanismus, der zur CagA-Translokation führt, sich zwischen den in *Lipid-rafts* lokalisierenden CEACAM-Rezeptoren (CEACAM1, CEA, CEACAM6) und CEACAM3 unterscheidet. Zur Klärung dieser Fragestellung sind weitere Experimente notwendig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals das Zusammenspiel zwischen einer spezifischen bakteriellen Adhäsion und dem Transfer des *H. pylori*-Effektorproteins CagA in die Wirtszelle. Diese Erkenntnisse eröffnen ein neues Feld in der *H. pylori*-Forschung. Einerseits handelt es sich bei den CEACAMs um die ersten Proteinrezeptoren, die durch ein äußeres Membranprotein erkannt werden. Darüber hinaus sind sowohl CEACAMs als auch *H. pylori*-Infektionen in hohe Maße für die Karzinogenese relevant.

## VI. Summary

About half the world's population is infected with the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. It is capable of successfully persisting at the gastric epithelium and causes an asymptomatic gastritis in most cases, but can also lead to more severe diseases like gastric ulcer or gastric cancer. *H. pylori* possesses a great variety of adhesion-mediating outer membrane proteins and virulence factors. The cytotoxin CagA, which is delivered into host cells via the *cag* type IV secretion system, plays a decisive role during infection. The adhesin HopQ has an influence on this transfer, but the underlying mechanism is not clear. The aim of this thesis was to identify new adhesin receptors and to examine their effect on the translocation of CagA.

For the first time this study shows that HopQ binds membrane bound members of the Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule family (CEACAMs). It specifically recognizes CEACAM5 (CEA), CEACAM1, 3 and 6. Furthermore, the results demonstrate an interaction with the IgV-like domain of CEA and CEACAM3, respectively. This allows the assumption that HopQ also binds the IgV-like domains of CEACAM1 and 6 and not the IgC-like domains of these proteins. Moreover, the amino acids at positions 43 and 44 of CEA influence this binding, implying that this area is directly involved in the interaction with HopQ.

Besides adhesion, the four CEACAMs also enable translocation of CagA in otherwise translocation-deficient HEK-293-cells. The delivery correlates with the HopQ mediated adhesion of *H. pylori* to these cells, suggesting that adhesion is required for the transmission of the toxin. However, a signalling that enables the transfer and is induced upon binding of *H. pylori* to CEACAMs cannot be ruled out. Hence, the relevance of IgC-like domains and clustering of CEA and its localization in lipid rafts for the translocation of CagA was examined. Removal of the IgC domains of CEA had no impact on the transfer. This indicates that no translocation-mediating signal is transmitted through the IgC domains. Clustering of CEA molecules upon cross-linking with antibodies lead demonstrably to a signalling inside the cells, but had also no effect on translocation. Moreover, this signalling was not induced by binding of *H. pylori* to CEA. This allows the conclusions that the signalling itself is not needed for delivery and that HopQ-mediated adhesion does not lead to clustering of CEA. In addition, the GPI anchorage of CEA seems unnecessary for translocation of CagA. Exchange of GPI with the transmembrane domain of CEACAM3 had no impact despite causing a delocalisation from lipid rafts. This implies the possibility of a lipid raft-independent delivery of CagA. Nevertheless the mechanism of transfer could differ between lipid rafts-associated CEACAMs and CEACAM3, but this hypothesis needs verification.

The results of this thesis demonstrate the interplay between adhesion and transfer of effector proteins. The results open a new field in *H. pylori* research because on one hand,

CEACAMs are the first identified protein receptors of an outer membrane protein and on the other hand, both CEACAMs and *H. pylori* are extremely relevant in carcinogenesis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Adhäsion

Der Ursprung des deutschen Worts „Adhäsion“ liegt im lateinischen „adhaesio“, was direkt übersetzt „Anhaften“ bedeutet. Es beschreibt den Zustand zweier Stoffe oder Körper, die aneinander haften. In der Physik bedeutet es das Aneinanderhaften zweier verschiedener Stoffe im Bereich der Grenzfläche. Auch in natürlichen Systemen, vor allem bei multizellulären Organismen, spielt die Adhäsion eine große Rolle. Beispielsweise ist die Abgrenzung zwischen verschiedenen Organen, die unter anderem durch Epithelien entsteht, einer der grundlegenden Schritte für die Ausbildung komplexer multizellulärer Organismen. Ein Epithel besteht aus polarisierten Zellen, die aneinander haften und dadurch eine Barriere bilden. Diese Adhäsion von Epithelzellen muss so aufgebaut sein, dass sie die unterschiedlichen Ansprüche, wie z. B. Schutzfunktion, Resorption und Sekretion, erfüllen kann. Diese Eigenschaften werden unter anderem durch verschiedene Adhäsionsmoleküle der Zellen ermöglicht. Eine weitere wichtige Funktion dieser Moleküle ist die Transduktion von Signalen aus der Umgebung ins Zellinnere und umgekehrt.

Die Relevanz der Adhäsion in biologischen Systemen wird auch bei der Betrachtung von pathogenen Bakterien deutlich, denn die Adhäsion an relevante Zellen des Wirtsorganismus ist der initiale Schritt für eine erfolgreiche Infektion. Durch das Anhaften an Wirtszellen entsteht eine physikalische Interaktion, die es einerseits für den Wirt schwieriger macht, die Infektion durch peristaltische Bewegungen und Sekretion von beispielsweise protektiven Muzinen zu beseitigen, und andererseits ermöglicht sie eine Signalübertragung (Kline *et al.* 2009).

Im Folgenden werden zelluläre, epitheliale sowie bakterielle Adhäsionsstrukturen genauer betrachtet. Der Schwerpunkt liegt dabei auf bakteriellen Adhäsionsmolekülen und deren Auswirkungen auf die Wirtszelle.

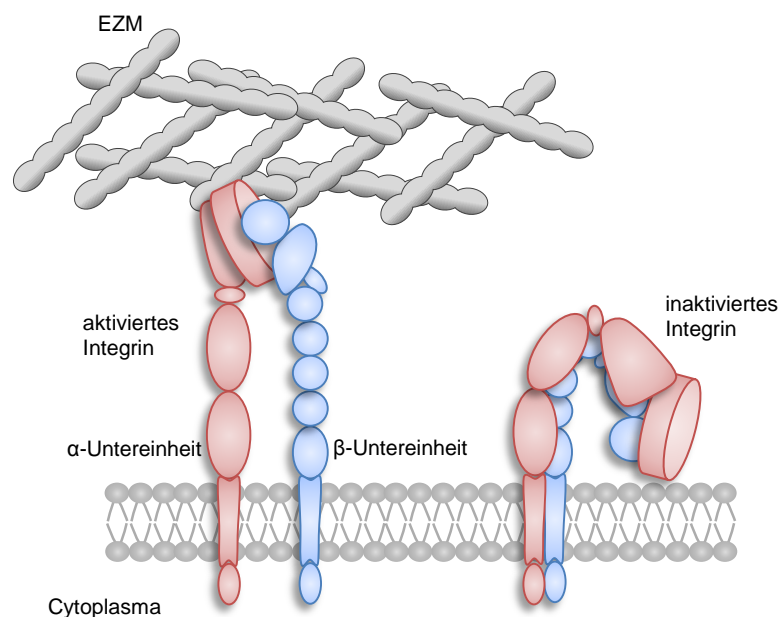
## 1.2 Zelluläre Adhäsionsmoleküle in humanen Epithelien

Die Organisation von komplexen multizellulären Strukturen in Organismen ist durch die Ausbildung von Organen und Gewebe möglich. Dafür müssen die Zellen untereinander und mit ihrer Umgebung in Verbindung stehen, sie müssen Signale aus der Umgebung wahrnehmen und aus der Zelle herausleiten. Die Zelladhäsion ist dadurch grundlegend für die Architektur von Geweben mitverantwortlich, aber auch für Zellwachstum, Zellmotilität, Differenzierung und für die Einleitung der Apoptose (Ruoslahti und Obrink 1996). Sämtliche Kontakte werden durch Zelladhäsionsmoleküle (CAM; *cell adhesion*

*molecules*) vermittelt. Dabei wird zwischen CAMs, die zu einer Bindung an die extrazelluläre Matrix (EZM) führen, und denen, die Zell-Zell-Kontakte herstellen, unterschieden. Die Interaktion von Zellen mit der EZM entsteht unter anderem durch Moleküle der Integrin- und der Syndecanfamilien, die in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 genauer beschrieben werden. Dagegen werden benachbarte Zellen durch Moleküle der Proteinfamilien der Cadherine, Selektine, Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), aber auch durch Integrine, verbunden (Aplin *et al.* 1999). Die IgSF inkludiert die Familie der karzinoembryonalen Antigen-Zelladhäsionsmoleküle (CEACAM; *carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule*), die in Abschnitt 1.2.3 genauer erläutert wird.

### 1.2.1 Aufbau und Funktion von Integrinen

Integrine sind Transmembranproteine, die eine Verbindung zwischen zwei Zellen oder zwischen Zellen und der EZM herstellen und ausschließlich bei vielzelligen Tieren (Metazoa) vorkommen (Hynes 2002). Aufgebaut sind sie jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die zusammengelagert ein Heterodimer ausbilden. Jede Untereinheit besteht aus einem kurzen cytoplasmatischen und einem großen extrazellulären Proteinanteil (s. Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Aufbau und Konformation eines Integrindimers.**

Dargestellt sind Integrinheterodimere im aktivierten und inaktivierten Konformationszustand. Sie bestehen aus einem großen extrazellulären und einem kleinen cytoplasmatischen Proteinanteil. Aktiviertes Integrin hat eine ausgestreckte Struktur und bindet mit hoher Affinität an EZM-Bestandteile. EZM: extrazelluläre Matrix

In Säugetieren gibt es 18 verschiedene  $\alpha$ - und acht verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten, die gewebespezifisch 24 unterschiedliche Heterodimere ausbilden können. Durch die vielfältigen Möglichkeiten der Zusammensetzung der Untereinheiten entstehen Heterodimere mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten (Kim *et al.* 2011).

Integrine vermitteln nicht nur Adhäsion an die EZM, sondern können auch Signale aus der Umwelt in die Zelle weiterleiten; ein Prozess, der *outside-in-signaling* genannt wird. Die Weitergabe der Signale innerhalb der Zelle beruht allerdings auf Gerüst- und Adaptorproteinen wie beispielsweise der fokalen Adhäsionskinase (FAK), der Src-Kinasen oder der Abl-Kinasen, da der cytoplasmatische Teil der Integrine keine enzymatische Aktivität besitzt (Giancotti und Ruoslahti 1999). Die entgegengesetzte Signalübertragung, also die aus dem Zellinneren nach außen, kann ebenfalls über Integrine ablaufen. Diese Richtung der Signaltransduktion wird als *inside-out-signaling* beschrieben. In den meisten Fällen wird so durch Aktivierung der Integrine die Adhäsionsaffinität gegenüber den Liganden gesteigert. Der Übergang von aktivierter bzw. inaktivierter Form und andersherum beruht auf einer Konformationsänderung (s. Abb. 1.1). Im inaktiven Zustand liegt das Heterodimer in einer gebeugten Struktur vor, wohingegen im aktiven Zustand eine ausgestreckte Konformation vorherrscht (Takagi *et al.* 2002).

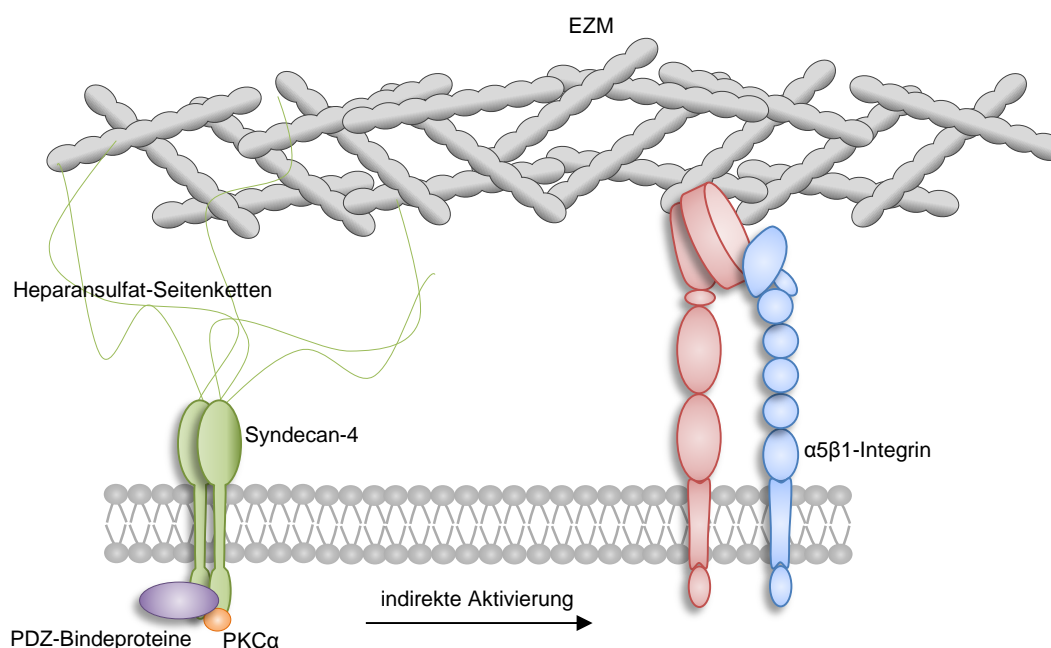
Für die Pathogenese von *Helicobacter pylori* spielt besonders der Fibronektin-Rezeptor  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin eine wichtige Rolle (s. 1.5.3). Er erkennt und bindet das EZM-Protein Fibronektin. Dabei wird spezifisch das in Fibronektin enthaltene Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Motiv erkannt.

### 1.2.2 Die Adhäsinfamilie der Syndecane

Die Transmembranproteine der Syndecan-Familie gehören zu den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG). Das heißt, sie besitzen einen kleinen Proteinanteil, der die Cytoplasmamembran durchspannt, sowie einen großen Anteil an Heparansulfat (HS)-Seitenketten. Neben den drei bis fünf HS-Ketten können sie zusätzlich Chondroitinsulfate enthalten. Die Familie besteht aus vier verschiedenen Syndecanen (1 bis 4), wovon drei gewebespezifisch sind. Dabei kommen Syndecan-1 und Syndecan-4 in Epithelzellen vor (Couchman 2010).

Die HS-Seitenketten können mit einer Vielzahl von extrazellulären Molekülen interagieren. Sie dienen zum einen als Korezeptoren für Wachstumsfaktoren und deren Tyrosinkinasen, zum anderen vermitteln sie wie Integrine auch Zelladhäsion an die EZM (s. Abb. 1.2), um nur zwei Beispiele der vielfältigen Funktionen zu nennen (Bishop *et al.* 2007). Nicht nur die Seitenketten, sondern auch der kleine Proteinkern der Syndecane kann alleine ohne Glykosylierung Zelladhäsion durch Integrine vermitteln. Die Ektodomäne, der extrazelluläre Proteinanteil des Moleküls, von Syndecan-1 beispielsweise aktiviert  $\beta 3$ - und  $\beta 5$ -Integrine durch direkte Bindung (Beauvais *et al.* 2009). Die Aktivierung von  $\beta 1$ -Integrin durch die Ektodomäne von Syndecan-4 ist hingegen indirekt (Whiteford und Couchman 2006). Neben der von der extrazellulären Seite vermittelten Zelladhäsion können Syndecane auch durch intrazelluläre Signale eine integrinabhängige Zelladhäsion auslösen (s. Abb. 1.2). Dabei spielt der cytoplasmatische Proteinanteil der Syndecane eine Rolle. Dieser besitzt drei verschiedene Domänen, die jeweils mit unterschiedlichen Molekülen interagieren können: die konservierten

Domänen C1 bzw. C2 und dazwischen eine variable, je nach Syndecan spezifische Domäne (V-Domäne). Die C1-Domäne interagiert mit den Aktinbindeproteinen Ezrin und Cortactin, aber auch mit der Familie der Src-Kinasen. Die C2-Domäne besitzt ein Glutamat-Phenylalanin-Tyrosin-Alanin (EFYA)-Motiv und erkennt PDZ-Proteine. Die variable Region von Syndecan-4 geht Bindungen mit  $\alpha$ -Aktinin, der **Proteinkinase C $\alpha$**  (PKC $\alpha$ ) und PI45P<sub>2</sub> ein. Durch die Interaktion mit PKC $\alpha$  und den dadurch ausgelösten Signalen kann Syndecan-4 zusammen mit  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin die Ausbildung von sogenannten *stress fibers* bewirken (Couchman 2010). Das sind geordnete Strukturen aus Bündeln von Aktinfilamenten, die mit  $\alpha$ -Aktinin verbunden sind. Sie dienen der Zelladhäsion und Morphogenese, tragen aber auch entscheidend zur Mechanotransduktion bei, einem Prozess, der es den Zellen ermöglicht mechanische Signale in chemische umzuwandeln. Diese kontraktile Bündel enden an der Cytoplasmamembran in sogenannten fokalen Adhäsionspunkten und stehen dadurch mit der EZM über Zelladhäsionsmoleküle wie Syndecan-4 und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin in Verbindung (Tojkander *et al.* 2012).



**Abb. 1.2: Aufbau und Funktion von Syndecan-4.**

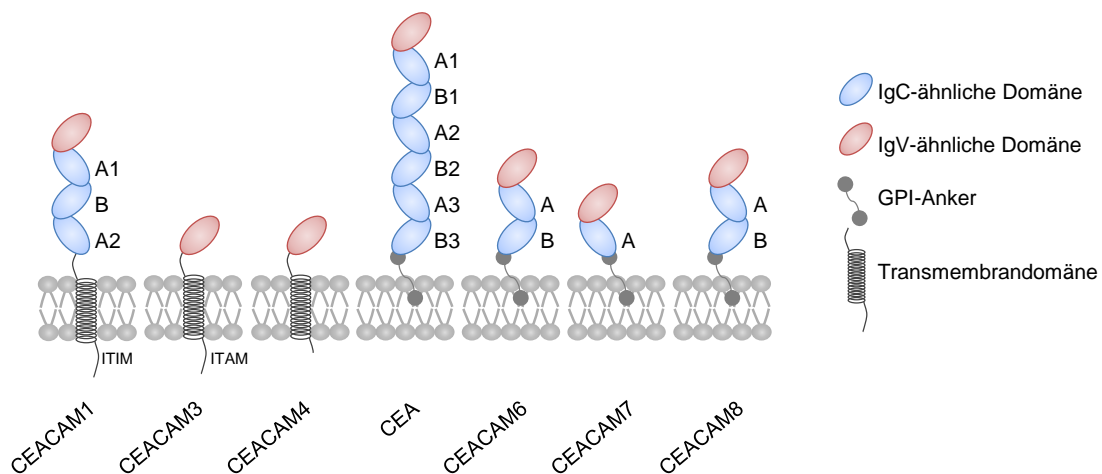
Syndecan-4 liegt als Dimer vor und hat drei bis fünf Heparansulfat-Seitenketten, die unter anderem Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (EZM) vermitteln. Der cytoplasmatische Teil kann unter anderem mit PKC $\alpha$  und PDZ-Bindeproteinen interagieren. Durch von Syndecan-4 ausgelöste intrazelluläre Signale kann der Fibronektinrezeptor  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin indirekt aktiviert werden.

### 1.2.3 Die karzinoembryonale Antigen-Zelladhäsionsmolekül-Familie – CEACAMs

Die Zelladhäsionsmoleküle der CEACAM-Familie sind Glykoproteine, die zu der Superfamilie der Immunglobulin-Zelladhäsionsrezeptoren (*immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules* IgCAMs) gehören und bisher nur in Säugetieren gefunden wurden. Sie vermitteln vor allem transiente Zell-Zell-Interaktionen und spielen bei der Zell-Zell-Erkennung eine wichtige Rolle (Kuespert *et al.* 2006). Dabei werden Kontakte

über homophile oder heterophile Interaktionen hergestellt, das heißt Wechselwirkungen zwischen gleichartigen oder unterschiedlichen IgCAMs. Die Verbindungen können entweder parallel, das heißt beide Bindungspartner befinden sich auf der gleichen Zelle, oder zwischen benachbarten Zellen (antiparallel) entstehen (Kuespert *et al.* 2006).

Die CEACAM-Zelladhäsionsmoleküle besitzen mindestens eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne. Diese Domänen stellen eine kompakte Struktur aus zwei aneinander gelagerten  $\beta$ -Faltblättern dar und bestehen aus ca. 85 bis 110 Aminosäuren. Dabei werden die Domänen aufgrund kleinerer Unterschiede in die Gruppen der konstanten (IgC) und der variablen (IgV) Ig-ähnlichen Domänen unterteilt (s. Abb. 1.3) (Vaughn und Bjorkman 1996, Kuespert *et al.* 2006). Alle CEACAMs besitzen eine IgV-ähnliche und bis zu sechs IgC-ähnliche Domänen. Die IgC-Domänen gehören zum Typ der konstanten IgC2-ähnlichen Domänen, lassen sich aufgrund ihrer Sequenz in A- bzw. B-Domänen einteilen, die abwechselnd, meist in Paaren, vorkommen. Die Befestigung der Proteine in der Cytoplasmamembran erfolgt entweder über eine Transmembrandomäne, was beispielsweise bei CEACAM1 und CEACAM3 der Fall ist, oder über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker, was unter anderem bei CEACAM5 (wird im weiteren durch CEA abgekürzt) und CEACAM6 der Fall ist (s. Abb. 1.3). GPI-verankerte CEACAMs wurden bisher nur bei Menschen und Primaten gefunden (Obrink 1997).



**Abb. 1.3: Übersicht über die CEACAM-Familie.**

Dargestellt sind CEACAM1, 3, 4, 6, 7, 8 und CEA. Alle CEACAMs besitzen eine variable IgV-ähnliche Domäne und bis zu sechs IgC-ähnliche Domänen. CEACAM1, 3 und 4 haben eine Transmembrandomäne und CEACAM6, 7, 8 und CEA haben einen GPI-Anker. ITIM: *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*, ITAM: *immunoreceptor tyrosin-based activation motif*

CEA, CEACAM1 und CEACAM6 sind unter normalen Bedingungen auf der apikalen Seite von Epithelzellen lokalisiert, dabei kommen sie vor allem im gastrointestinalen Trakt sowie auf anderen Schleimhäuten vor. CEACAM1 wird neben Epithelzellen zusätzlich auf Leukocyten und nach Induktion auf T-Zellen produziert (Kuespert *et al.* 2007). CEACAM3 hingegen ist nur auf Granulocyten zu finden und vermittelt weder



homo- noch heterophile Interaktionen (Nagel *et al.* 1993, Pils *et al.* 2008). In Tumoren findet man meistens eine Hochregulierung von CEA und CEACAM6, was zur Entdeckung und Namensgebung dieser Moleküle führte. Die Herstellung von CEACAM1 hingegen ist in Tumorgeweben verglichen zu gesundem Gewebe geringer (Chevinsky 1991, Neumaier *et al.* 1993).

*In vitro* kann durch vermehrte Produktion von CEA bzw. CEACAM6 die Differenzierung und Polarisierung verschiedener Zelllinien gehemmt werden. Das deutet drauf hin, dass die Überexpression dieser CEACAM-Gene zur Ausbildung von Tumoren beitragen kann (Eidelman *et al.* 1993, Ilantzis *et al.* 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Anoikis, der programmierte Tod von Zellen, die den Kontakt zur EZM verloren haben, durch erhöhte Produktion von CEA bzw. CEACAM6 aber nicht CEACAM1 inhibiert wird (Ordonez *et al.* 2000). Diese durch CEA- bzw. CEACAM6-vermittelte Inhibierung scheint durch eine gesteigerte Interaktion zwischen  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und dessen EZM-Rezeptor Fibronektin hervorgerufen zu werden, ohne dabei die Menge des Integrins auf der Zelloberfläche zu beeinflussen (Ordonez *et al.* 2007). Dabei liegt diesem Mechanismus unter anderem die Kolokalisierung von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin mit CEA zu Grunde (Camacho-Leal *et al.* 2007, Ordonez *et al.* 2007).

CEACAM1 kann in bis zu zwölf verschiedenen Spleißvarianten vorkommen und besitzt je nach Ausführung einen cytoplasmatischen Teil, der ein ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) enthält (Chen *et al.* 2001, Kuespert *et al.* 2006). Das Motiv kann nach intrazellulärer Rezeptordimerisierung und der darauf folgenden Phosphorylierung mit den zellulären Phosphatasen SHP-1, SHP-2 und den Src-Kinasen interagieren und diese aktivieren (Brummer *et al.* 1995, Huber *et al.* 1999, Gray-Owen und Blumberg 2006). CEACAM3 hingegen enthält im cytoplasmatischen Teil ein ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*), das durch Src-Kinasen phosphoryliert werden kann. Die Bindung von Bakterien an CEACAM3-produzierende Zellen führt zu einer raschen aktinabhängigen Aufnahme, die nur mit einem intakten ITAM möglich ist (Hauck *et al.* 1998, McCaw *et al.* 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CEA und CEACAM6 eher für die Struktur von Epithelien wichtig sind, wogegen CEACAM1 in unterschiedlichen Zelltypen vorkommt und verschiedenste Funktionen hat. Außerdem spielt CEACAM3 eine Rolle für die Immunantwort und hat dabei die Eigenschaft als Zelladhäsionsmolekül verloren.

### 1.3 Bakterielle Adhäsionsmechanismen

Eine Adhäsion von Bakterien an Wirtszellen, Oberflächen oder an andere Bakterien, beispielsweise in Biofilmen, bedeutet in erster Linie Schutz vor äußeren Einflüssen. Im gastrointestinalen Trakt bewahrt sie Bakterien vor der Klärung durch sekretierten antimikrobiellen Mukus und peristaltischen Bewegungen. An Oberflächen und in

Biofilmen ermöglicht Adhäsion den Bakterien in Kolonien zu wachsen und somit eine gesteigerte Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen. Zusätzlich kann ein Ausweichen des nativen Immunsystems und somit Schutz erreicht werden, indem lösliche Komponenten auf der Bakterienoberfläche gebunden werden (Kline *et al.* 2009). Insgesamt ist die Adhäsion der erste und kritische Schritt der Kolonisierung und trägt später zur Persistenz von pathogenen Bakterien bei. Die Adhäsion erfolgt in allen Fällen durch Moleküle, die auf der Zelloberfläche der Bakterien exponiert sind. Das können zum einen Polysaccharidstrukturen sein, die Bestandteile der Zellwand bzw. Kapseln sind, oder aber Proteinstrukturen.

Die äußere Zellhülle von gramnegativen Bakterien besteht aus einer asymmetrischen Lipiddoppelschicht, wobei die innere aus Phospholipiden und die äußere Schicht aus Lipopolysaccharid (LPS) aufgebaut ist. Das Lipopolysaccharid besteht aus drei Komponenten: LipidA, Polysaccharid-Kernregion und O-spezifische Seitenketten. Das LipidA ist als Endotoxin ein wichtiger Faktor für die Pathogenese von gramnegativen Bakterien. Das LipidA von *H. pylori* ist stark modifiziert und hat eine 500-fach schwächere Toxizität im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien, wodurch *H. pylori* die Immunantwort des Wirts verringert (Sheu *et al.* 2010).

Bakterielle Proteinstrukturen, die Adhäsion vermitteln, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1. filamentöse polymere Strukturen, genannt Fimbrien und 2. Nicht-Fimbrien-Adhäsine. Zusätzlich zu diesen zwei Gruppen wurde in letzter Zeit vermehrt über die von Flagellen ausgehende Adhäsion berichtet. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Bindung von *Escherichia coli* O157 an bovine rektale Epithelzellen von den Flagellen abhängig ist (Roy *et al.* 2009). Darüber hinaus konnte für das Flagellum von *Pseudomonas aeruginosa* eine Bindung an HS und HSPGs demonstriert werden (Bucior *et al.* 2012).

Fimbrien, auch Pili genannt, sind filamentöse Strukturen, die zum Teil bakterielle Polysaccharidkapseln überspannen können, jedoch meistens kürzer als Flagellen sind. In *E. coli* wurden zwei unabhängige adhäsionsvermittelnde Pili beschrieben: ein Typ-1-Pilus, codiert durch das *fim*-Operon, und ein Pap-Pilus, lokalisiert im *pap*-Operon. Beide Pili sind heteropolymer und bestehen im Wesentlichen aus einer Proteingruppe die den Pilusschaft bildet, und einer kleineren Gruppe von Proteinen, die sich an der Spitze des Pilus befinden. FimH und PapG an der Spitze des Pilus binden an Kohlenhydrate und sind die eigentlichen adhäsionsvermittelnden Bestandteile der Pili (Kline *et al.* 2009).

Nicht-Fimbrien-Adhäsine sind Proteine, die in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien verankert sind und aus diesem Grund auch äußere Membranproteine (OMPs; *outer membrane proteins*) genannt werden. Ein Beispiel dafür ist das trimere Autotransporterprotein YadA von *Yersinia enterocolitica*, das unter anderem an die EZM-Proteine Kollagen und Laminin bindet (Girard und Mourez 2006). Die durch YadA-vermittelte Bindung ermöglicht den Bakterien die Injektion von Effektorproteinen durch ein Typ-3-Sekretionssystem in die Wirtszelle (Mikula *et al.* 2012). Im Folgenden

wird die Adhäsion von äußeren Membranproteinen und Fimbrien an HS bzw. HSPGs und an CEACAMs genauer betrachtet.

### 1.3.1 Adhäsion von Bakterien an HS und HSPGs

HSPGs kommen sowohl auf der Zelloberfläche von adhärenenten Zellen als auch in der EZM vor (s. 1.2.2) und sind somit als initiale Liganden für bakterielle Adhäsionsmoleküle geeignet. Im Jahr 1995 demonstrierten van Putten und Paul, dass *Neisseria gonorrhoeae* mit Opazitätsproteinen (Opa) an HSPGs (Opa<sub>HS</sub>) binden kann und dadurch die Invasion ermöglicht wird (van Putten und Paul 1995). Eine Überexpression der Gene von Syndecan-1 bzw. Syndecan-4 führte dementsprechend zu einer erhöhten Invasion in Epithelzellen. Die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne hingegen, die zur Signaltransduktion beiträgt (s. 1.2.2), hemmt den Invasionsprozess (Freissler *et al.* 2000). Dies bedeutet, dass durch die Adhäsion an Syndecan ein Signal über dessen cytoplasmatische Domäne weitergeleitet wird und zur Aufnahme der Bakterien führt. Genauer betrachtet ist die intrazelluläre Dimerisierungsdomäne, die an PKC $\alpha$  und PI45P<sub>2</sub> bindet, sowie das EFYA-Motiv von Syndecan-4 für die Invasion notwendig (Freissler *et al.* 2000). Des Weiteren konnte durch Infektionsexperimente mit HEp-2-Zellen ein für  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-spezifischer Aufnahmemechanismus identifiziert werden, der nur funktioniert, wenn HSPGs auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Das deutet darauf hin, dass die Opa-HSPG-Interaktion eine molekulare Verbindung zu  $\beta 1$ -Integrin und Fibronektin herstellt, welche die Aufnahme ermöglichen (van Putten *et al.* 1998).

Die grampositiven Bakterien *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* nutzen die Bindung an HSPGs ebenfalls zur Invasion. Bei *S. agalactiae* bindet das Alpha C-Protein an Syndecan-1, was zur Aufnahme durch eine Rho-GTPase-abhängige Änderung des Aktincytoskeletts führt (Chen *et al.* 2008).

Sequenzanalysen des äußeren Membranproteins LcrG von *Y. enterocolitica* ermittelten ein heparinbindendes Motiv. Experimentell konnte daraufhin gezeigt werden, dass LcrG heparinabhängig an HeLa-Zellen bindet, da eine Behandlung der Zellen mit Heparitinase die Adhäsion inhibierte (Boyd *et al.* 1998). Des Weiteren wurde eine Bindung von LcrG an Heparin-Agarose beobachtet, was auf eine direkte Interaktion zwischen LcrG und HSPGs schließen lässt. Die durch hinzugefügtes Heparin verminderte Adhäsion von LcrG an HSPG führte *in vitro* ebenfalls zu einer geringeren Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszellen (Boyd *et al.* 1998). Das Anhaften von *Yersinia* an Wirtszellen durch Adhäsionsmoleküle (YadA s. 1.3 und LcrG) spielt also für die erfolgreiche Translokation von Effektorproteinen und somit für die Virulenz der Bakterien eine entscheidende Rolle.

Für *H. pylori* konnte im Jahr 1993 durch Ascencio und Kollegen eine Bindung an <sup>125</sup>I-Heparansulfat gezeigt werden. Etwa 90 % der 17 getesteten *H. pylori*-Stämme wiesen eine Interaktion auf, die in Anwesenheit von nichtmarkiertem Heparansulfat und Heparin inhibiert werden konnte. Hingegen hatten Chondroitinsulfate bzw. Dermatan sulfate keinen Einfluss auf die Bindung, was den Schluss zulässt, dass *H. pylori* einen speziellen

Heparansulfatrezeptor besitzt (Ascencio *et al.* 1993). Darüber hinaus war nach proteolytischer Behandlung der äußeren Membran der Bakterien die Bindung an HS reduziert (Ascencio *et al.* 1993). Diese Daten deuten auf einen membranständigen Rezeptor hin. Kawasaki und Kollegen (1996) beschrieben hingegen, dass die Adhäsion des *H. pylori* NCTC 11637-Stamms an Hs 198.St-Zellen (Zelllinie aus gastrischem Gewebe), Hs 746T-Zellen (humane Adenokarzinom-Zelllinie) bzw. HeLa-Zellen unabhängig von Glykosaminoglykanen (GAG) wie Heparin bzw. HS ist. Die Bindung der Bakterien an die Zellen war unabhängig von einer enzymatischen Ablösung der HSPGs und konnte auch nicht durch vorhergegangene Zugabe von Heparansulfat, Heparin oder Chondroitinsulfat gemindert werden (Kawasaki *et al.* 1996). Diese Arbeiten beziehen sich allerdings lediglich auf einen einzelnen *H. pylori*-Stamm und es stellt sich somit die Frage, wie repräsentativ diese Daten für andere *H. pylori*-Stämme sind. Außerdem wurde in Experimenten mit einem HSPG-bindenden *H. pylori*-Stamm eine HSPG-abhängige Adhäsion an HeLa-Zellen gezeigt, was einen direkten Konflikt zu den Daten von Kawasaki und Kollegen darstellt (Guzman-Murillo *et al.* 2001). Die gleiche Arbeitsgruppe isolierte HSPG-bindende Proteine aus *H. pylori*-Kulturüberständen und charakterisierte diese, was wiederum für ein lösliches heparinbindendes Protein spricht (Ruiz-Bustos *et al.* 2001). Insgesamt geben die Daten keinen vollständigen Aufschluss darüber, ob *H. pylori* HSPG-bindende Proteine besitzt und wenn ja, ob diese membranständig sind, oder in den Überstand sekretiert werden. Neben der potenziellen Bindung an HS bzw. HSPGs werden weitere Adhäsionsmechanismen von *H. pylori* im Abschnitt 1.6 ausgeführt.

### 1.3.2 Bakterielle Adhäsion an CEACAMs

Der Aufbau einer engen Interaktion mit Zellen eines Epitheliums ist für viele Bakterien ein essenzieller Schritt für die Etablierung einer Infektion. CEACAMs eignen sich aufgrund ihrer apikalen Lokalisation auf der Zelloberfläche von Epithelien und ihrer Fähigkeit Signale ins Zellinnere weiterzugeben hervorragend als Rezeptoren (s. 1.2.3). Die Bindung an CEACAMs bzw. das Zusammenlagern der Rezeptoren kann zu einer Neuordnung des Cytoskeletts führen, gefolgt von der Initiierung der Internalisierung, aber auch zu einer Signalantwort innerhalb der Zelle (Hauck *et al.* 2006).

Die pathogenen Bakterien können entweder an die Glykosylierungen oder an den Proteinanteil von CEACAMs binden. Die Enterobakterien *E. coli* und *Salmonella* erkennen überwiegend die Zuckerstrukturen der CEACAM-Moleküle (Kuespert *et al.* 2006). Die Bindung von *E. coli* an CEA beispielsweise kann durch aufgereinigte Typ-I-Fimbrien sowie  $\alpha$ -glykosidische Mannose inhibiert werden. Somit ist die Bindung der Typ-I-Fimbrien an CEA auf dessen Glykosylstrukturen zurückzuführen (Leusch *et al.* 1991). Neben der Bindung an die Zuckerstrukturen der CEACAMs zeigte eine Untersuchung von rekombinant hergestellten und somit nicht glykosylierten N-Domänen von CEA hingegen eine direkte Interaktion mit dem Dr-Adhesin von *E. coli* (Korotkova *et al.* 2008a). Diese Bindung führte *ex vivo* zu einer Dissoziation der Rezeptordimere. Die

Dr-Adhesine von *E. coli* umfassen zwei Untereinheiten: die Hauptstruktur bestehend aus DraE/AfaE, die den *decay-accelerating factor* (DAF, CD55) bzw. verschiedene CEACAMs (CEA, CEACAM1, 3 und 6) erkennt, und die DraD/AfaD-Untereinheiten an der Spitze des Pilus. Die DraE-Untereinheit reicht alleine für eine Internalisierung, die durch die Bindung an die CEACAM Rezeptoren vermittelt wird, aus (Korotkova *et al.* 2008b). Die Aufnahme ist dabei von *Lipid-rafts*, Mikrotubuli und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) abhängig. Eine Auflösung der *Lipid-rafts* bzw. das Zerstören von Mikrotubuli und der PI3K inhibiert die Dr-CEACAM-vermittelte Aufnahme der Bakterien. Des Weiteren findet an der Stelle der Adhäsion der Bakterien eine vermehrte Zusammenlagerung von  $\beta$ 1-Integrin, phosphoryliertem Ezrin und PI3K sowie Tubulin statt, die mit der Internalisierung in Verbindung gebracht werden (Korotkova *et al.* 2008b).

Die am besten untersuchte Adhäsion an CEACAMs und deren Folgen ist die von Neisserien. Die pathogenen *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* können mittels bestimmten Opa-Proteinen an CEACAMs (Opa<sub>CEA</sub>) binden, genauer gesagt an die IgV-Domäne von CEACAM1, 3, 6 und CEA, wohingegen CEACAM4, 7 und 8 nicht erkannt werden (Chen und Gotschlich 1996, Virji *et al.* 1996a, Hauck *et al.* 1998, Hauck und Meyer 2003). Nach der Bindung erfolgt eine Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen-Familie und der Rac1-abhängigen Signaltransduktionskaskade, die eine Internalisierung der Bakterien zur Folge hat (Hauck *et al.* 1998). Die Aktivität der Src-Kinase ist essenziell für die Aufnahme, vermutlich aufgrund der dadurch ausgelösten Neuordnung des Aktincytoskeletts (Hauck und Meyer 2003). Der Mechanismus der Internalisierung unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen CEACAM-Rezeptoren. Für die CEACAM1-vermittelte Aufnahme ist die Transmembrandomäne von entscheidender Bedeutung, die den Rezeptor nach Bindung in *Lipid-raft*-Mikrodomänen befördert. Ein Austausch der CEACAM1-Transmembrandomäne gegen die von CEACAM3 führt dazu, dass der Rezeptor nicht mehr in den Mikrodomänen lokalisieren kann und die Internalisierung der Bakterien in diesem Falle auch nicht mehr abhängig von der Integrität der *Lipid-rafts* ist. Des Weiteren ist die Aufnahme unabhängig von der cytoplasmatischen Domäne, inkl. dem ITIM von CEACAM1, und somit ist auch eine Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors hier nicht notwendig (Muenzner *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu ist die Internalisierung durch den auf Granulocyten vorkommenden CEACAM3-Rezeptor (s. 1.2.3) abhängig von seinem cytoplasmatischen ITAM (Schmitter *et al.* 2004). Die Bindung von Neisserien an CEACAMs löst also unterschiedliche Antworten je nach Rezeptor und Zelltyp aus.

Ebenfalls an die IgV-Domäne bindet das humanpathogene gramnegative Bakterium *Moraxella catarrhalis*. Dessen äußeres Membranprotein UspA1, das zur Familie der allgegenwärtigen Oberflächenproteine (*ubiquitous surface protein*, Usp) gehört, erkennt die IgV-ähnliche Domäne von CEACAM1 (Hill und Virji 2003). Die von *M. catarrhalis* hervorgerufene Apoptose in A549-Zellen (Lungen-Epithelzelllinie) ist abhängig von UspA1. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit

CEACAM1-spezifischen Antikörpern vor der Infektion eine reduzierte Apoptose zur Folge hatte. Außerdem führt die Produktion von CEACAM1 in HeLa-Zellen zu einer deutlich stärkeren Apoptose bei der Infektion mit *M. catarrhalis* im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen (N'Guessan *et al.* 2007). Die Interaktion zwischen UspA1 von *M. catarrhalis* mit CEACAM1 induziert folglich Apoptose und trägt so möglicherweise zur Entwicklung der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung bei.

*Haemophilus influenzae* besiedelt ebenso die Atemwege des Menschen und bindet dabei auch an CEACAM1. Die Adhäsion erfolgt meist über das variable äußere Membranprotein P5, wobei ebenfalls die IgV-Domäne der Ligand ist. Dennoch bindet ein Teil der Bakterien auch dann an CEACAM1 im zellulären Kontext, wenn kein P5 produziert wird, was für ein zusätzliches, bisher nicht identifiziertes Adhäsin spricht (Virji *et al.* 2000, Hill *et al.* 2001).

Die drei Bakterienspezies *H. influenzae*, *M. catarrhalis* und Neisserien haben nicht nur gemeinsam, dass sie an CEACAMs binden können, sondern auch, dass dadurch die Expression des Endoglin-Gens (CD105) induziert wird, das zur TGF- $\beta$ 1-Rezeptorfamilie gehört. Die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors stimuliert die Aktivierung von  $\beta$ 1-Integrin, wodurch dessen Affinität zur EZM gesteigert und somit die Zelladhäsion erhöht wird (Muenzner *et al.* 2005). Dadurch können die Bakterien der Abschlüpfung von Epithelzellen, ein Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort, entgegenwirken.

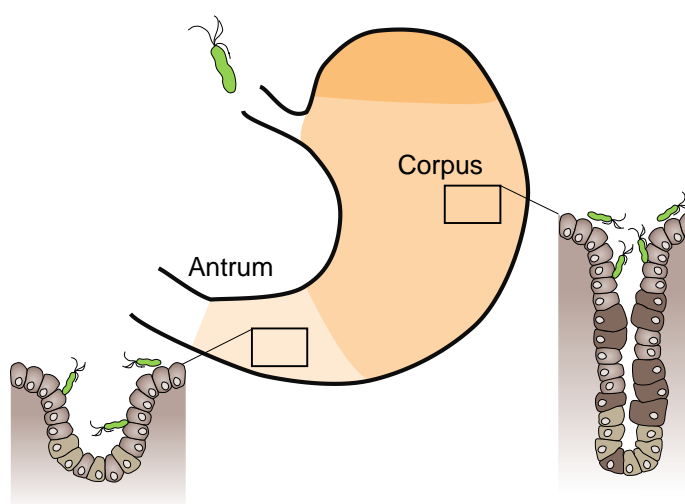
Diese Beispiele verdeutlichen das Zusammenspiel zwischen Adhäsion und Virulenz, die beide wichtige Faktoren für eine erfolgreiche Infektion bzw. Pathogenese sind.

#### 1.4 Das humanpathogene Bakterium *H. pylori*

*H. pylori* ist ein mikroaerophiles, stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, das den Magen von Menschen besiedelt. Es wird phylogenetisch den  $\epsilon$ -Proteobakterien zugeordnet und wurde im Jahr 1984 aus der Magenmukosa von Patienten mit chronischer Gastritis isoliert (Marshall und Warren 1984). Schon im Jahr darauf konnte der direkte Zusammenhang zwischen der Besiedelung von *H. pylori* und der Entwicklung einer akuten Gastritis hergestellt werden (Marshall *et al.* 1985). Aufgrund der mit einer Infektion assoziierten Entwicklung von Magengeschwüren, chronischer atrophischer Gastritis und Magenkarzinomen wurde *H. pylori* 1994 von der Weltgesundheitsorganisation zu einem Kanzerogen der Stufe I klassifiziert.

Im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien ist *H. pylori* in der Lage, im menschlichen Magen zu persistieren, was zu einer chronischen Infektion führt. Die Prävalenz beträgt aufgrund der erfolgreichen chronischen Besiedelung und der Koevolution mit dem Menschen weltweit ca. 50 %. Die Infektionsraten sind dabei jedoch stark von sozioökonomischen Bedingungen beeinflusst (Suerbaum und Michetti 2002).

Aufgrund des sauren Milieus im Magen wurde lange Zeit angenommen, dass eine Besiedelung durch Bakterien nicht möglich ist. *H. pylori* ist aber durch spezifische Faktoren so gut an diese spezielle Nische angepasst, dass es keine Probleme hat, dem lebensfeindlichen Milieu zu entkommen, indem es in die Mukusschicht eindringt und zum Teil an die Magenmukosa adhäriert. Für diese initiale Kolonisierung sind die Spiralforn, die Begeißelung und die Aktivität der bakteriellen Urease entscheidend. In den meisten Fällen führt die Besiedelung zu einer asymptomatischen chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis) (Suerbaum und Michetti 2002, Salama *et al.* 2013). Nur in 15 % der Fälle kommt es zu schwereren Erkrankungen, wobei das Risiko hierfür von der Umwelt, aber auch von der Virulenz des Stamms und der genetischen Voraussetzung des Individuums abhängt (Atherton 2006). Des Weiteren bedingt die Lokalisation der Infektion die Folgeerkrankungen. So führt eine Besiedelung im Antrum des Magens zu einer höheren Säureproduktion, was im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Zwölffingerdarmgeschwürs steht. Dagegen kann die Infektion des Corpus zur Entstehung von Magengeschwüren oder -karzinomen beitragen (s. Abb. 1.4) (Atherton 2006).



**Abb. 1.4 Vereinfachte Übersicht des Magens.**

Dargestellt ist die Besiedelung von *H. pylori* in den verschiedenen Bereichen des Magens. Die Lokalisation der Infektion wirkt sich auf die Entstehung von Folgeerkrankungen aus.

Ein weiteres durch *H. pylori* hervorgerufenen Krankheitsbild ist das sogenannte „*mucosa associated lymphoid tissue*“ (MALT)-Lymphom. Dabei wird die Schleimhaut von Lymphocyten und Plasmazellen infiltriert. Eine Eradikation von *H. pylori* führt in den meisten Fällen zu einem Rückgang dieser Erkrankung (Wotherspoon 1998).

## 1.5 Virulenzfaktoren von *H. pylori* und deren Wirkungsweisen

Der Verlauf einer Infektion mit *H. pylori* und die dadurch entstehenden Folgeerkrankungen werden nicht nur durch die genetische Prädisposition des Wirts, sondern auch durch die variierende Zusammensetzung der Virulenzfaktoren des Bakteriums beeinflusst. Aufgrund der sehr großen Unterschiede in den Genomsequenzen verschiedener Isolate von *H. pylori* spricht man hier von einem Pan-Genom (Fischer *et al.* 2010). Dies ermöglicht unter anderem eine genaue Anpassung der Bakterien an die Unterschiede der Wirtsindividuen.

Die grundlegende Voraussetzung für das Überleben aller *H. pylori*-Stämme ist aber das Entkommen von den lebensfeindlichen Bedingungen des Magens und der Immunantwort des Menschen. Obwohl *H. pylori* an die Nische des Magens angepasst ist, ist es nicht säureresistent. Schon nach wenigen Minuten unter sauren Bedingungen kommt es zum irreversiblen Verlust der Motilität (Schreiber *et al.* 2005). Die Penetration der Mukusschicht ist der entscheidende erste Schritt, um dem sauren Milieu zu entkommen, und ist somit essenziell für die Kolonisierung. Dabei wird die Orientierung in Richtung der Schleimhaut durch Chemotaxis anhand des pH-Gradienten der Mukusschicht sichergestellt (Schreiber *et al.* 2004, Terry *et al.* 2005). Die Chemotaxis ist im Corpus nur für die initiale Besiedelung essenziell, wogegen sie im Antrum zusätzlich für eine erfolgreiche Proliferation grundlegend ist (Rolig *et al.* 2012).

Die Bewegung durch den Mukus wird durch die helikale Form und die Motilität durch die unipolare Begeißelung von zwei bis sechs Flagellen ermöglicht. Die Form scheint zwar im Tiermodell für die Kolonisierung nicht unbedingt nötig zu sein, dennoch hatten Mutanten mit einer anderen Gestalt einen entscheidenden Nachteil bei einer multiplen Infektion im Vergleich zum Wildtyp (Sycuro *et al.* 2010). Die Motilität hingegen ist im Tiermodell essenziell für eine Kolonisierung (Eaton *et al.* 1992).

Die Bewegung in der Mukusschicht und durch sie hindurch wird durch die Funktion des Ureasekomplexes erleichtert. Dabei werden lokal Ammoniumionen produziert, die zu einer Änderung des pH-Werts und dadurch der Viskoelastizität des Mukus führen (Celli *et al.* 2007, Celli *et al.* 2009). Die Urease ist ein nickelabhängiger Enzymkomplex, der in den Genclustern *ureA/B* und *ureE-I* codiert ist und bis zu 10 % des Gesamtprotein-gehaltes von *H. pylori* ausmachen kann (Bauerfeind *et al.* 1997). Die 2013 publizierte Struktur zeigt eine neuartige hexamere Kanalstruktur des Komplexes auf, der in der inneren Cytoplasmamembran sitzt (Strugatsky *et al.* 2013). Dabei setzt das Enzym Urea (Harnstoff) in Kohlenstoffdioxid und Ammoniumionen um, was zu einer Neutralisierung des pH-Werts in der Umgebung des Bakteriums sowie im Periplasma führt (Posselt *et al.* 2013, Strugatsky *et al.* 2013). Diese Funktionen machen die Urease zu einem essenziellen Kolonisierungsfaktor im Tiermodell (Eaton *et al.* 1991, Kavermann *et al.* 2003).

An der Epithelschicht des Magens befindet sich das eigentliche Habitat von *H. pylori*. Die Adhäsion an das Epithel durch äußere Membranproteine und deren Auswirkungen auf die Wirtszellen ist in Abschnitt 1.6 genauer beschrieben.



Weitere Faktoren, die den Wirt beeinflussen, sind unter anderen die sekretierten Proteine VacA (s. 1.5.1), HtrA und die  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) sowie das durch ein Typ-4-Sekretionssystem (T4SS; s. 1.5.3) injizierte Toxin CagA (s. 1.5.2 und 1.5.3)

### 1.5.1 Das vakuolisierende Cytotoxin VacA

VacA (*vacuolating cytotoxin A*) ist ein multifunktionales Toxin, das durch einen Autotransportermechanismus sekretiert wird. Das 140 kDa große Protoxin besitzt eine N-terminale Sec-abhängige Signalsequenz und eine C-terminale, für die Sekretion über die äußere Membran essenzielle Autotransporterdomäne (Posselt *et al.* 2013). Durch die Sekretion entsteht das 88 kDa große Toxin, das entweder auf der Zelloberfläche verbleibt oder in die Umgebung abgegeben wird (Schmitt und Haas 1994, Nguyen *et al.* 2001).

An die Wirtszellen gebunden wird das Toxin internalisiert und bildet dann anionenselektive Kanäle in der Endosomenmembran aus, wodurch diese zu großen Vakuolen, die namensgebend sind, heranreifen. Diese haben sowohl Merkmale von Endosomen als auch Lysosomen (Palframan *et al.* 2012). Des Weiteren lokalisiert VacA in Mitochondrien, wo es mit der Cytochrom-C-Freisetzung und dadurch ausgelöster Apoptose in Zusammenhang gebracht wird (Galmiche und Rassow 2010). Außerdem löst VacA in Abhängigkeit von der kanalformenden Funktion die Bildung von Autophagosomen in Epithelzellen aus (Terebiznik *et al.* 2009). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Autophagie durch die Bindung von VacA an den LRP1-Rezeptor ausgelöst wird. Andere Epithelzellrezeptoren von VacA hingegen, wie zum Beispiel RPTP $\alpha$ , RPTP $\beta$  oder Fibronectin, hatten keinen Einfluss darauf (Yahiro *et al.* 2012).

Eine weitere wichtige Funktion von VacA ist die Modulation von Immunzellen. In infizierten Makrophagen zum Beispiel kommt es zur VacA-abhängigen Inhibierung der Phagosomenreifung (Zheng und Jones 2003). Das hat zur Folge, dass sich ein Zellkompartiment bildet, das als Megasom bezeichnet wird. *H. pylori* ist in der Lage, in diesem nicht gereiften Phagosom zu überleben (Allen *et al.* 2000). Außerdem interferiert VacA mit der Antigenpräsentation auf B-Lymphocyten (Molinari *et al.* 1998) und inhibiert die T-Zell-Aktivierung durch Modifizierung der Interleukin-2 (IL-2)-Expression (Gebert *et al.* 2003, Sundrud *et al.* 2004).

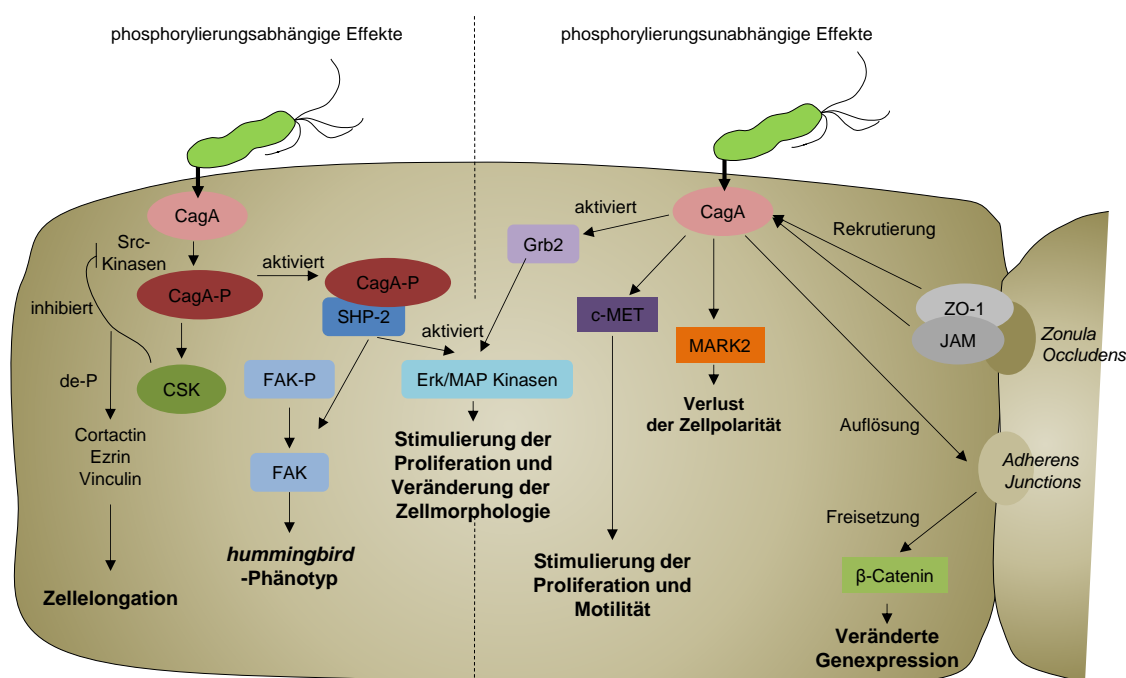
Für die Kolonisierung im Tiermodell scheint VacA kein essenzieller Faktor zu sein, doch VacA-produzierende Stämme haben gegenüber Deletionsmutanten einen Vorteil bei der Kolonisierung während einer gemischten Infektion. Alle bisher aus Menschen isolierten *H. pylori* Stämme tragen das *vacA*-Gen im Chromosom, was für einen Vorteil bei der Kolonisierung und der Persistenz im nativen Wirt spricht (Cover und Blanke 2005).

### 1.5.2 Der Einfluss von CagA auf Epithelzellen

Das Cytotoxin-assoziierte Gen A (*cagA*) liegt auf der ca. 40 kbp großen *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI), die durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde

(Covacci *et al.* 1999). Schon in den frühen 90er Jahren wurde CagA in Zusammenhang mit der Entwicklung von Zwölffingerdarmgeschwüren und der cytotoxischen Aktivität der Bakterien gebracht (Cover *et al.* 1990, Covacci *et al.* 1993). Das 120 bis 140 kDa große Protein wird durch das T4SS (s. 1.5.3), das ebenfalls durch die *cag*-PAI codiert ist, in die Wirtszellen transloziert und anschließend dort tyrosinphosphoryliert (Asahi *et al.* 2000, Backert *et al.* 2000, Odenbreit *et al.* 2000). Die Phosphorylierung findet an den Glutamat-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-Alanin (EPIYA)-Motiven am C-terminalen Bereich des Toxins statt (Stein *et al.* 2002). Es gibt vier unterschiedliche EPIYA-Motive (A, B, C und D), die von der geografischen Region abhängig sind. Das EPIYA-C-Motiv kommt beispielsweise hauptsächlich in Isolaten aus westlichen Ländern in Europa, Nordamerika und Australien vor (Backert *et al.* 2010). Die Anzahl der EPIYA-Motive kann von Stamm zu Stamm variieren, was auf die repetitiven Sequenzen an den flankierenden Bereichen der Motive zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung des Toxins an den EPIYA-Motiven beruht auf den zellulären Tyrosinkinasen der Src- und der Abl-Familien (Stein *et al.* 2002, Poppe *et al.* 2007, Tammer *et al.* 2007). Die Src-Kinasen spielen dabei bei der frühen Infektion eine Rolle, wogegen die Abl-Kinasen CagA erst zu späteren Zeitpunkten phosphorylieren.

Unphosphoryliertes sowie phosphoryliertes CagA (CagA-P) ist in der Lage, mit einer Reihe von zellulären Proteinen zu interagieren und deren Funktionen zu modulieren (s. Abb. 1.5). Phosphoryliertes CagA aktiviert die Tyrosinphosphatase SHP-2 durch direkte Bindung (Higashi *et al.* 2002). Das hat einerseits zur Folge, dass die fokale Adhäsionskinase (FAK) durch Dephosphorylierung inhibiert wird, was einen Einfluss auf die Zellmotilität bzw. die Zellelongation hat und unter anderem zur Ausbildung des sogenannten CagA-abhängigen *hummingbird*-Phänotyps beiträgt (s. Abb. 1.5) (Tsutsumi *et al.* 2006). Andererseits aktiviert der CagA-P-SHP-2-Komplex die Erk/MAP-Kinasen, wodurch die Zellproliferation moduliert wird (Higashi *et al.* 2004). Neben der Bindung an SHP-2 bindet CagA-P auch an die C-terminale Src-Kinase (CSK), was zu einer negativen Rückkopplungsschleife der CagA-Phosphorylierung führt (Tsutsumi *et al.* 2003). Die Aktivierung der CSK führt nämlich zur Inhibition der Src-Kinasen-Familie (SKF), wodurch die Phosphorylierung von CagA gehemmt wird (Murata-Kamiya 2011). Zudem verschiebt die Inhibition der SKF das Gleichgewicht in Richtung der Dephosphorylierung der Aktinbindepoteine Cortactin, Ezrin und Vinculin (s. Abb. 1.5), was die Zellelongation begünstigt und somit ebenfalls den *hummingbird*-Phänotyp unterstützt (Selbach *et al.* 2003, Selbach *et al.* 2004, Moese *et al.* 2007).



**Abb. 1.5: Darstellung der Effekte des Cytotoxins CagA auf Epithelzellen.**

Die Auswirkungen des Cytotoxins CagA können in phosphorylierungsabhängige bzw. -unabhängige Effekte unterteilt werden. Die Auswirkungen von phosphoryliertem CagA (CagA-P) sind hauptsächlich die Zellelongation, der *hummingbird*-Phänotyp sowie die Stimulierung der Proliferation und der Veränderung der Zellmorphologie. Letztere zwei werden durch die Aktivierung der SHP-2-Phosphatase und deren Folgen hervorgerufen. Die Aktivierung der CSK führt nicht nur zu einer negativen Rückkopplung der Phosphorylierung von CagA, sondern auch zur Dephosphorylierung (de-P) der Aktinbindepoteine Cortactin, Ezrin und Vinculin. Diese Dephosphorylierung trägt dann zur Zellelongation bei. Phosphorylierungsunabhängig stimuliert CagA ebenfalls die Proliferation sowie die Zellmotilität. Des Weiteren kommt es zum Verlust der Zellpolarität und zur Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen (*Zonula Occludens* und *Adherens Junctions*). Außerdem wird unter anderem durch freigesetztes  $\beta$ -Catenin die Genexpression verändert.

Durch Experimente mit mutiertem phosphorylierungsdefizienten CagA wurden verschiedene zelluläre Interaktionspartner identifiziert, die ebenfalls zur Pathogenese beitragen. Dennoch bleibt bis jetzt ungeklärt, ob nicht-phosphoryliertes CagA unter nativen Bedingungen überhaupt in der Zelle vorliegt. Insgesamt führt CagA phosphorylierungsunabhängig zur Aktivierung von mitogenen und pro-inflammatorischen Signalen sowie zum Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zell-Verbindungen (Wroblewski *et al.* 2010). Dabei aktiviert CagA phosphorylierungsunabhängig die membranständige Tyrosinkinase c-MET, was einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und die Motilität hat (Churin *et al.* 2003). Darüber hinaus bindet CagA an die mikrotubulaffinitätsregulierende Kinase-2 (MARK2 bzw. PAR1b) und bewirkt so die Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen und den Verlust der Zellpolarität (s. Abb. 1.5) (Saadat *et al.* 2007). Durch Zerstörung des E-Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplexes durch CagA werden nicht nur die sogenannten *Adherens Junctions* aufgelöst, sondern es kommt auch zur Freisetzung von  $\beta$ -Catenin (s. Abb. 1.5). Im Zellkern wirkt sich  $\beta$ -Catenin dann positiv auf bestimmte Transkriptionsfaktoren aus (Franco *et al.* 2005, Murata-Kamiya *et al.* 2007). Neben den *Adherens Junctions* hat

CagA auch auf die *Zonula Occludens* einen Einfluss, indem es an das *Zonula Occludens*-1 (ZO-1)-Protein sowie an JAM-A (*junctional adhesion molecule 1*) bindet. Das hat zur Folge, dass sich an der Bindungsstelle des Bakteriums eine unvollständige *Zonula Occludens* aufbaut (Amieva *et al.* 2003). Zusätzlich werden ebenso die Phospholipase C $\gamma$  und das Adapterprotein Grb2 von nicht-phosphoryliertem CagA beeinflusst (s. Abb. 1.5) (Wroblewski *et al.* 2010).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CagA einen beträchtlichen Einfluss auf die unterschiedlichsten Funktionen der Zellen hat, die zur Pathogenese von *H. pylori* beitragen. Dabei scheint die Phosphorylierung von CagA eine entscheidende Rolle zu spielen. In Tierexperimenten mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass nur die Produktion von phosphorylierungskompetentem CagA zur Ausbildung von Magenkarzinom, Dünndarmkrebs und B-Zellen-Lymphom führte (Ohnishi *et al.* 2008). In mit CagA-positiven *H. pylori*-infizierten Menschen hingegen kommt es nur selten zur Entwicklung eines Karzinoms im Vergleich zu der Häufigkeit bei den Tierexperimenten. Dennoch sind die von CagA ausgelösten Veränderungen wie die Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, Motilität und die Stimulierung der Proliferation krebsfördernde Prozesse. Dies verdeutlicht, dass die genaue Funktion von CagA und deren Folgen bzw. die Wechselwirkungen mit anderen Virulenzfaktoren bis heute nicht vollständig geklärt sind.

### 1.5.3 Das Typ-4-Sekretionssystem der *cag*-Pathogenitätsinsel und der Translokationsmechanismus von CagA

Für pathogene Bakterien ist es unter anderem wichtig, Virulenzfaktoren in die Wirtszelle zu injizieren. Ein möglicher Mechanismus dafür sind Typ-4-Sekretionssysteme (T4SS), welche die bakterielle Zellwand und zum Teil auch die eukaryotische Membran durchspannen, um Moleküle, wie DNA oder Effektorproteine über die Membranen zu transportieren. Dabei bilden T4SS einen Pilus aus, der eine nadelähnliche Struktur besitzt. Das auf der *cag*-PAI codierte T4SS (Cag-T4SS) wurde aufgrund von Homologien zu den Vir-Proteinen von *Agrobacterium tumefaciens* entdeckt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Proteine für die Induktion von IL-8 und anderen proinflammatorischen Signalen durch Epithelzellen verantwortlich sind (Censini *et al.* 1996, Akopyants *et al.* 1998). T4SS wie beispielsweise das von *A. tumefaciens*, das DNA in die Wirtszelle transloziert, haben elf essenzielle Komponenten (VirB1 bis VirB11) und ein Kopplungsprotein (VirD4). Nur wenige dieser Komponenten lassen sich durch offensichtliche Sequenzhomologien in der *cag*-PAI von *H. pylori* finden, nämlich die Proteine CagE (VirB4), CagX (VirB9), CagY (VirB10) und CagA (VirB11) (Fischer 2011). Für die Induktion von IL-8 hingegen sind 14 bis 15 Gene der *cag*-PAI notwendig (s. Tab. 1). Dies sind zum einen die Proteine, die Homologien zu den VirB-Proteinen des T4SS von *A. tumefaciens* aufzeigen und zum anderen weitere *H. pylori*-spezifische Proteine (Fischer *et al.* 2001, Selbach *et al.* 2002). Das deutet auf ein für *H. pylori*-

spezifisches T4SS hin, das sich von den bisher beschriebenen Systemen unterscheidet und nur entfernt mit diesen verwandt ist.

Aufgrund ihrer Eigenschaften können die Apparatsproteine in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Proteine, die für die IL-8 Induktion und die Translokation von CagA essenziell sind, 2. Proteine, die nur für die CagA-Translokation essenziell sind und 3. Proteine, die zum Teil die IL-8 Induktion und CagA-Translokation unterstützen, aber dafür nicht essenziell sind (s. Tab. 1). Die Zuordnung der Proteine CagI, CagG und CagD ist aufgrund von widersprüchlichen Daten nicht eindeutig möglich (Fischer *et al.* 2001, Selbach *et al.* 2002, Cendron *et al.* 2009).

**Tab. 1: Auflistung der Komponenten des Cag-T4SS.**

Die Apparatsproteine lassen sich in Proteine die sowohl für die IL-8-Sekretion als auch die CagA-Translokation essenziell sind, Proteine, die nur für die CagA-Translokation essenziell sind und in nicht essenzielle Proteine, die aber zum Teil die IL-8-Sekretion bzw. die CagA-Translokation unterstützen können (hier nicht gekennzeichnet), einteilen. Die grau hinterlegten Proteine lassen sich aufgrund widersprüchlicher Daten nicht eindeutig zuordnen. Die zu dem VirB/D4 System homologen Proteine sind gekennzeichnet. Das Effektorprotein CagA ist hier nicht dargestellt. Die Daten wurden nach Fischer (2011) zusammengestellt.

Protein	VirB Homolog	Essenziell für IL-8-Sekretion u. CagA-Translokation	Essenziell für CagA-Translokation	nicht essenziell
CagZ/Cag1				+
CagE/Cag2				+
CagD/Cag3		+		
CagY/Cag4	VirB1	+		
CagB/Cag5	VirD4		+	
CagA	VirB11	+		
CagZ			+	
CagY	VirB10	+		
CagX	VirB9	+		
CagW	VirB6	+		
CagV	VirB8	+		
CagU		+		
CagT	VirB7	+		
CagS				+
CagQ				+
CagP				+
CagM		+		
CagN				+
CagL	VirB5		+	
CagI		+	+	

Protein	VirB Homolog	Essenziell für IL-8-Sekretion u. CagA-Translokation	Essenziell für CagA-Translokation	nicht essenziell
CagH		+		
CagG			+	+
CagF			+	
CagE	VirB3/4	+		
CagD			+	+
CagC		+		
CagB				

Das bisher einzige bekannte Effektorprotein des Cag-T4SS ist das Cytotoxin CagA (s. 1.5.2). Zusätzlich deuten Daten zwar darauf hin, dass Fragmente von Peptidoglykan ebenfalls mittels Cag-T4SS in die Wirtszelle gelangen, doch die Details dieses Transports sind bisher nicht bekannt (Viala *et al.* 2004). Für die Translokation von CagA wurde  $\beta$ 1-Integrin als essenzieller Wirtszellfaktor identifiziert (Kwok *et al.* 2007, Jimenez-Soto *et al.* 2009). Es konnte gezeigt werden, dass CagL mit einem RGD-Motiv, das auch auf den natürlichen Liganden von Integrinen wie beispielsweise Fibronektin zu finden ist, an  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin binden kann und dadurch die CagA-Translokation ermöglicht wird (Kwok *et al.* 2007). Diese Daten stehen jedoch im Widerspruch zu Infektionsexperimenten in denen gezeigt wurde, dass das RGD-Motiv von CagL weder für die Induktion von IL-8 noch für die Translokation von CagA essenziell ist (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Des Weiteren konnte in dieser Studie nur eine schwache Interaktion mit  $\beta$ 1-Integrin festgestellt werden, die jedoch unabhängig vom RGD-Motiv war. Neben CagL können das Effektorprotein CagA und die Apparatsproteine CagY bzw. CagI mit  $\beta$ 1-Integrin interagieren (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Somit scheint  $\beta$ 1-Integrin ein wichtiger Rezeptor für das Cag-T4SS zu sein, wobei jedoch unklar ist, weshalb das Effektorprotein ebenfalls an diesen bindet. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass CagA auf der Oberfläche von *H. pylori* und auch an der Spitze der Pilusstruktur gefunden wurde (Kwok *et al.* 2007, Jimenez-Soto *et al.* 2009, Murata-Kamiya *et al.* 2010). Dabei ist jedoch nicht bekannt, ob das am Ende der Pilusstruktur lokalisierte CagA ein Intermediat der CagA-Translokation darstellt oder nicht.

Neben  $\beta$ 1-Integrin bindet CagA an Phosphatidylserin, wodurch die Aufnahme initiiert wird (Murata-Kamiya *et al.* 2010). Daneben wurde gezeigt, dass die Translokation von CagA durch verschiedene Integrinantikörper sowie durch Reduzierung des  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrins auf der Zelloberfläche inhibiert werden kann. Zusätzlich steigert sich die CagA-Translokation nach der Aktivierung der Integrine durch Zugabe von Mangan-Ionen (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Dies alles sind Hinweise darauf, dass der Translokationsmechanismus von CagA von  $\beta$ 1-Integrin und dessen Aktivierung sowie der Lokalisation von CagA an der Pilusspitze abhängig ist. Der zugrunde liegende

Mechanismus und die Frage nach weiteren notwendigen Faktoren bleiben dabei jedoch ungeklärt.

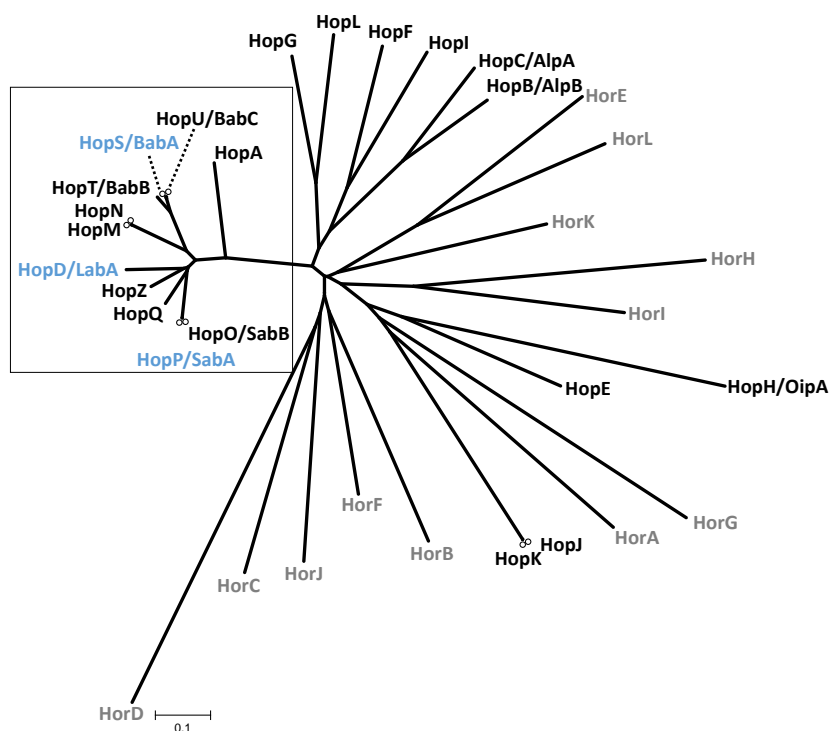
Die Translokation von CagA wird nachgewiesen über dessen Tyrosinphosphorylierung, die innerhalb der Wirtszelle stattfindet (s. 1.5.2). Dabei wird in den meisten Fällen außer Betracht gelassen, dass es sich hier um den Nachweis der CagA-Phosphorylierung, die von zellulären Faktoren abhängig ist, und nicht um den eigentlichen Translokationsprozess handelt. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob sich auch nicht-phosphoryliertes CagA in der Zelle befindet, das durch diese Methode nicht detektiert wird und dadurch potenziell zu falschen Ergebnissen führen könnte. Dennoch wird in dieser Arbeit ebenfalls angenommen, dass jede Translokation von CagA auch dessen Phosphorylierung zur Folge hat, die wiederum immunologisch detektiert werden kann.

## 1.6 Äußere Membranproteine von *H. pylori* und deren adhäsive Eigenschaften

Im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien besitzt *H. pylori* ein großes Spektrum an äußeren Membranproteinen (OMPs, *outer membrane proteins*). Aufgrund von Genomanalysen geht man von bis zu 60 verschiedenen OMPs aus, die sich in fünf verschiedene Gruppen einteilen lassen (Tomb *et al.* 1997): 1. die Hop-Familie (*H. pylori outer membrane proteins*) ist die Hauptgruppe mit ca. 30 Proteinen, 2. die Hor-Familie (*Hop related proteins*), 3. die sehr konservierte Hof-Familie (*Helicobacter OMP family*), 4. die Hom-Familie (*Helicobacter outer membrane*). Die fünfte Familie besteht aus den Effluxpumpenproteinen (Alm *et al.* 2000). Die Familie der Hop-Proteine beinhaltet die wichtigsten bisher bekannten Adhäsine, BabA, SabA und LabA (vgl. Abb. 1.6). BabA, eines der dominierenden Adhäsine von *H. pylori*, führt zusammen mit dem Toxin VacA und CagA zu einer gesteigerten Kolonisierung und erhöht die Wahrscheinlichkeit, eine gastrische Inflammation zu entwickeln. Das Adhäsin bindet an das fucosylierte Blutgruppenantigen Lewis<sup>b</sup> und an das nahverwandte H1-Antigen (Boren *et al.* 1993, Ilver *et al.* 1998, Rad *et al.* 2002). Die BabA-vermittelte Adhäsion an Lewis<sup>b</sup> löst T4SS-abhängige Signale aus, wodurch unter anderem die proinflammatorischen Cytokine CCL5 und IL-8 induziert werden (Ishijima *et al.* 2011).

SabA adhärert ebenfalls an Blutgruppenantigene, ist aber spezifisch für die Bindung an sialysierte Lewis<sup>x</sup>- und Lewis<sup>a</sup>-Antigene (Mahdavi *et al.* 2002). Sialysierte Glykokonjugate sind im gesunden Magen jedoch selten und werden erst bei einer Inflammation produziert. Es ist somit wahrscheinlich, dass SabA bei der initialen Kolonisierung nicht entscheidend ist, sondern bei späteren Zeitpunkten der Infektion entscheidend zur Persistenz der Bakterien beiträgt (Mahdavi *et al.* 2002). Die Expression beider Adhäsine wird unter anderem durch Phasenvariabilität und Genkonversion reguliert, was eine schnelle Anpassung an Veränderungen der Epithelschicht sicherstellt (Posselt *et al.* 2013). Neben Lewis<sup>b</sup> kommt auf MUC5A-Muzinen auch das GalNAcβ1-

4GlcNAc (LacdiNAc)-Motiv vor, das erst kürzlich als Rezeptor von HopD erkannt wurde (Rossez *et al.* 2014). Die Autoren der Studie schlagen aus diesem Grund vor, HopD in LabA (**L**acdiNAc **B**indeprotein **A**) umzubenennen.



**Abb. 1.6: Phylogenetische Einteilung der Hop- und Hor-Proteinfamilie von *H. pylori*.**

Der phylogenetische Baum wurde mit dem *Neighbor-Joining*-Verfahren berechnet. In grauer Schrift sind die Proteine der Hor-Familie und in schwarz die der Hop-Familie dargestellt. Die putative Adhäsinfamilie ist mit einem schwarzen Kästchen versehen. Für die blau hervorgehobenen Adhäsine ist der jeweilige Rezeptor bekannt.

Das mit SabA nahverwandte Protein HopQ befindet sich phylogenetisch ebenfalls in der putativen Adhäsinfamilie der Hop-Proteine (s. Abb. 1.6). Die HopQ-Proteine werden in zwei Familien, HopQ-Typ-I und HopQ-Typ-II eingeteilt. Typ-I-Allele kommen häufiger in CagA/VacA-positiven Stämmen vor, die eine gesteigerte Virulenz besitzen, als in CagA-negativen (Cao und Cover 2002). In einer Studie von 2008 zeigte die Deletion des *hopQ* Typ-I-Allels unterschiedliche Phänotypen. Während zwei Klone keine Veränderung in der Adhärenz an AGS-Zellen zeigten, führte die Deletion in zwei anderen Klonen zur stärkeren Bindung an AGS-Zellen, die eine erhöhte CagA-Phosphorylierung ohne Veränderung der IL-8 Induktion zur Folge hatte. Das deutet darauf hin, dass die gesteigerte Adhärenz den Translokationsmechanismus beeinflusst, ohne dabei eine Auswirkung auf die Produktion der Komponenten des T4SS zu haben. Die Autoren der Studie schlossen trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse auf eine durch HopQ hervorgerufene Abschwächung der Adhäsion (Loh *et al.* 2008). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass bei Prä- und Koinfektionsexperimenten in Magenepithelzellen die Deletion von *hopQ* in dem einen Stamm zu einer signifikanten Zunahme der CagA-



Translokation des anderen Stammes führt (Jimenez-Soto *et al.* 2013). Des Weiteren wurde HopQ als für die CagA-Translokation essenzielles Protein identifiziert. Die Deletion von *hopQ* hatte eine reduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und eine verminderte IL-8 Induktion, beides abhängig von der *cag*-PAI, zur Folge, führte aber nicht zu einer reduzierten Adhäsion an Zellen (Belogolova *et al.* 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher ungeklärt ist, ob das äußere Membranprotein HopQ Adhäsion vermittelt und welchen Einfluss es auf das T4SS bzw. die Translokation von CagA hat.

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

*H. pylori* kolonisiert und persistiert im menschlichen Magen unter anderem deshalb so erfolgreich, weil es durch die Vielfalt seiner äußeren Membranproteine gut an diese spezielle Nische angepasst ist. Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an den Wirt durch OMPs führt in vielen Fällen nicht nur zu einer Anhaftung, sondern auch zu einer Signaltransduktion, die eine erfolgreiche Infektion oft erst ermöglicht.

Bisher sind nur wenige Adhäsine von *H. pylori* und deren Rezeptoren identifiziert und nur im Falle von BabA scheint die Adhäsion dazu zu führen, dass T4SS-abhängige Signale ausgelöst werden. Ziel dieser Arbeit war es also, neue Adhäsine und deren Rezeptoren zu identifizieren. Dabei sollte der Schwerpunkt auf äußere Membranproteine gelegt werden, die einen Einfluss auf das Typ-4-Sekretionssystem bzw. die CagA-Translokation haben und wie beispielsweise HopQ zur putativen Adhäsinfamilie gehören. Das Zusammenspiel zwischen der Adhäsion von Bakterien an Wirtszellen und der dadurch ausgelösten Signale, die sich positiv auf die Translokation von Effektorproteinen bzw. die Internalisierung auswirken, ist für viele andere Bakterien gezeigt. Für das Bakterium *H. pylori* sollte dementsprechend in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch hier die Adhäsion eine Signaltransduktion zur Folge hat, welche die CagA-Translokation ermöglicht bzw. diese positiv beeinflusst. Dabei sollte der Fokus besonders auf die Zelladhäsionsmoleküle der Syndecan- und der CEACAM-Familie gelegt werden. Für diese beiden Familien ist nicht nur gezeigt, dass andere humanpathogene Bakterien an sie binden und dadurch Signale innerhalb der Zelle auslösen, sondern auch, dass sie  $\beta$ 1-Integrin stimulieren können, was wiederum für die CagA-Translokation entscheidend ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

### 2.2 Verwendete Bakterienstämme und Bakterienkultivierung

#### 2.2.1 Anzucht und Stammhaltung von *E. coli* Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder im flüssigen oder auf festem *Luria-Bertani* (LB, 20 g/l Lennox-L-Medium bzw. 32 g/l Lennox-L-Agar, Life Technologies) Komplexmedium, das bei Bedarf nach dem Autoklavieren mit den entsprechenden Antibiotika (s. Tab. 2) versetzt wurde. Die Bebrütung der Bakterien wurde bei 37 °C durchgeführt, flüssige Kulturen wurden zusätzlich bei 140 rpm geschüttelt.

Die Stammhaltung der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 20 % Glycerin bei -70 °C.

**Tab. 2: Konzentrationen der für *E. coli* verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration
Ampicillin (Sigma-Aldrich)	100 mg/l
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	50 mg/l
Chloramphenicol (Fluka)	30 mg/l
Streptomycin (Sigma-Aldrich)	250 mg/l
Erythromycin (AppliChem)	250 mg/l

#### 2.2.2 Anzucht und Stammhaltung von *H. pylori* Bakterien

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf GC-Agar (36 g/l GC-Agar-basis, Oxoid), der nach dem Autoklavieren mit 12,5 % Pferdeserum, Vitaminmix (100 g/l  $\alpha$ -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil), Nystatin (4,4 U/ml, Sigma-Aldrich) und Trimetoprim (5 mg/l, Sigma-Aldrich) versetzt wurde. Die Kultivierung der Stämme erfolgte bei 37 °C und täglicher Passage in einem Inkubator für mikroaerophile Bedingungen (Scholzen) bei einer Atmosphäre von 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>. Für die Anzucht der Bakterien aus der Cryokonservierung wurden die Stämme zunächst für drei Tage bebrütet und danach ein- bis zweimal passagiert bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

Das Medium für Flüssigkulturen bestand aus *Brucella Broth* (BB)-Medium (BD), das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Life Technologies) versetzt wurde. Die Flüssigkulturen wurden in Anaerobiertöpfen unter mikraerophilen Bedingungen (s.o.) bei 37 °C und 80 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Zur Selektion wurden Antibiotika nach dem Autoklavieren zu den Medien, wie in Tab. 3 aufgelistet hinzugefügt.

Die Kryokonservierung erfolgte in BB-Medium mit 10 % FCS und 20 % Glycerin bei -70 °C.

**Tab. 3: Konzentrationen der für *H. pylori* verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	8 mg/l
Chloramphenicol (Fluka)	6 mg/l
Streptomycin (Sigma-Aldrich)	250 mg/l
Erythromycin (AppliChem)	10 mg/l

### 2.2.3 Verwendete Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4) sind alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *H. pylori*-Bakterienstämme aufgelistet. Im folgendem wird nicht zwischen P12-Wildtyp bzw. dem streptomycinresistenten P12-Wildtyp und P12  $\Delta hopQ::cat$  bzw. der markerfreien Deletion von *hopQ* (P12 $\Delta hopQ$ ) unterschieden, da die genotypischen Unterschiede die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beeinflussen.

**Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme**

Stamm-hintergrund	Interne Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP 10		F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacO74 recA1$ <i>ara</i> $\Delta 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK$ <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Life Technologies, Karlsruhe (Grant <i>et al.</i> 1990)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		F- $\Phi 80d lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+)</i> <i>phoA supE44 <math>\lambda</math>-thi-l gyr A96</i> <i>relA1</i>	Life Technologies, Karlsruhe (Hanahan 1983)
<i>H. pylori</i> P12	LH-P193	P12 $\Delta sabB2/hopQ$	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	LH-P150	Wildtyp; Klinisches Isolat (888-0) der Universität Hamburg	(Schmitt und Haas 1994)
<i>H. pylori</i> P12	LH-P151	P12 $\Delta hopQ::cat$	(Ertl 2012)

Stamm- hintergrund	Interne Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>H. pylori</i> P12	LH-P202 (VK-H80)	P12 $\Delta$ hopQ	(Königer, Holsten <i>et al.</i> Manuskript in Vorbereitung)
<i>H. pylori</i> P12	LH-P204	P12 $\Delta$ sabB:: <i>rpsL-erm</i> $\Delta$ sabB2 $\Delta$ hopQ	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	LH-P206	P12 $\Delta$ sabB:: <i>rpsL-erm</i> $\Delta$ sabB2	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	LH-P209	Streptomycin resistenter Wildtyp Stamm	AG R. Haas MvP
<i>H. pylori</i> P12	LH-P229	pHel4-GFP	(Königer, Holsten <i>et al.</i> Manuskript in Vorbereitung)
<i>H. pylori</i> P12	LH-P230	$\Delta$ hopQ; pHel4-GFP	Luisa Jiménez-Soto
<i>H. pylori</i> 26695	LH-P61	Wildtyp; erster komplett Genom-sequenzierter <i>H. pylori</i> Stamm	(Tomb <i>et al.</i> 1997)
<i>H. pylori</i> G27	LH-P67	Wildtyp; Klinisches Isolat aus dem Krankenhaus in Grosseto in Italien	(Covacci <i>et al.</i> 1993)

#### 2.2.4 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Die optische Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Hierzu wurden die Bakterien von der Agarplatte abgelöst und in Puffer oder Medium resuspendiert oder direkt aus einer Flüssigkultur entnommen. Anschließend wurde die Extinktion der Bakteriensuspension im Photometer (DR 2000, Hach) gegen den entsprechenden Leerwert bei einer Wellenlänge von 550 nm oder 600 nm gemessen. Eine optische Dichte von 0,1 bei 550 nm entspricht ca.  $3 \times 10^7$ /ml *H. pylori* Bakterien.

### 2.3 Genetische Manipulation von Bakterien

#### 2.3.1 Transformation von *H. pylori*

Es wurden zwei verschiedene Methoden für die Transformation verwendet, die beide auf der natürlichen Kompetenz von *H. pylori* aufbauen: zum einen in Flüssigmedium, zum anderen auf festem Medium. Für die Transformation in Flüssigmedium wurde *H. pylori* mit einer OD<sub>550</sub> von 0,2 in 1 ml BB-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und in eine 24-Napfschale überführt. Nach 1-2 h Bebrütung unter mikraeophilen Bedingungen wurde 30 ng bis 1 µg Plasmid DNA oder chromosomale DNA hinzugefügt und die Bakterien erneut vier bis sechs Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien auf

Selektivmedium ausplattiert und drei bis sechs Tage kultiviert bis Einzelkolonien weitergeführt werden konnten. Die Transformation auf festem Medium erfolgte, indem die DNA auf eine GC-Agarplatte (2.2.2) getropft wurde und anschließend mit einem Wattestab mit Bakterien einer Übernachtskultur vermenget wurde. Der Ansatz wurde über Nacht inkubiert, die Bakterien anschließend in BB-Medium aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert.

### 2.3.2 Elektroporation von *H. pylori* (Segal und Tompkins 1993)

Die Elektroporation wurde in Fällen angewandt, in denen die Transformation nicht erfolgreich war. Hierzu wurden die Bakterien in PBS (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) aufgenommen und auf 1 ml mit einer  $\text{OD}_{550}$  von 1 verdünnt. Anschließend wurden zwei Waschschriffe durchgeführt in denen die Bakterien zunächst für 5 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert, vom Überstand befreit und anschließend in 500 µl kaltem Elektroporationspuffer (2,43 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,57 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 272 mM Saccharose und 15 % Glycerin) resuspendiert wurden. Nach einer abschließenden Sedimentation der Bakterien wurden diese in 80 µl Elektroporationspuffer gelöst und in eine gekühlte Küvette (1 mm, NeoLab) gegeben. Dem Ansatz wurden 500 ng DNA zugefügt und anschließend erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 200  $\Omega$  und 25 µF in einem Elektroporationsgerät (Bio-Rad). Im direkten Anschluss wurde 1 ml BB mit 10 % FCS hinzugegeben und die Suspension in eine 24-Napfplatte überführt. Die Bakterien wurden nach einer vier bis sechs stündigen Bebrütung auf Selektivmedium ausplattiert.

### 2.3.3 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* erfolgte grundlegend nach der Rubidium-Chlorid-Methode von Hanahan (Hanahan 1983). Es wurden 100 ml LB-Medium mit *E. coli* angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{550}$  der Bakterien von 0,5-0,6 schüttelnd (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (2800 g, 15 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in kaltem sterilen TFB I Puffer (30 mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 100 mM RbCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,2) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation erfolgte die Resuspension in 4 ml sterilem TFB II Puffer (10 mM MOPS, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,5). Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert (50 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen bis zur Verwendung erfolgte bei -70 °C.

### 2.3.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* (Sambrook J. 2001)

Zunächst wurde ein Aliquot (50 µl, s. 2.3.3) chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterienzellen auf Eis langsam aufgetaut. Daraufhin wurden 1 bis 50 ng Plasmid-DNA

oder 3 bis 30 µl Ligationsansatz (2.6.7) hinzugegeben und die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Für eine höhere Transformationseffizienz wurde ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C durchgeführt. Direkt nach dem Hitzeschock erfolgte die Zugabe von 1 ml LB Medium. Anschließend wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 180 rpm kultiviert bevor sie auf Selektivantibiotikaplatten ausplattiert wurden.

## 2.4 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

### 2.4.1 Verwendete Zelllinien

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 5) sind die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Zelllinien aufgelistet.

**Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien**

Name	Beschreibung	Eigenschaften	Referenz
AGS	Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie		ATCC CRL-1739
Cho lec 3.2.8.1	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters	vier unabhängige Mutationen in den N- und O-Glykosylierungsbiosynthesewegen	(Stanley 1989)
Cho lec 3.2.8.1 α5β1	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters	Sekretieren die Ektodomänen von α5β-Integrin als Heterodimer (von L. Terradot)	(Takagi <i>et al.</i> 2001)
HEK-293	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren kein CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM8	ATCC CRL-1573 (Graham <i>et al.</i> 1977)
HEK-293 CEA	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA	diese Arbeit
HEK-293 CEA R43S Q44L	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA R43S Q44L	diese Arbeit
HEK-293 CEA R43S Q44L-N-GFP	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Sekretieren CEA R43S Q44L-N-GFP	diese Arbeit
HEK-293 CEA V39C	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA V39C	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Eigenschaften	Referenz
HEK-293 CEA V39C-N-GFP	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Sekretieren CEA V39C-N-GFP	diese Arbeit
HEK-293 CEA*	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA	(Nägele 2010)
HEK-293 CEACAM1	Humane primäre embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEACAM1	diese Arbeit
HEK-293 CEACAM3	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEACAM3	diese Arbeit
HEK-293 CEA-HA	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA-HA	diese Arbeit
HEK-293 CEA-N/3-TM	Humane primäre embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEA-N/3-TM	diese Arbeit
HEK-293 CEA-N-GFP	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Sekretieren CEA-N-GFP	diese Arbeit
HEK-293 CEAA2-B3-HA	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAA2-B3-HA	diese Arbeit
HEK-293 CEAA3-B3-HA	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAA3-B3-HA	diese Arbeit
HEK-293 CEAAIgC	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAAIgC	diese Arbeit
HEK-293 CEAAIgC R43S Q44L	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAAIgC R43S Q44L	diese Arbeit
HEK-293 CEAAIgC V39C	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAAIgC V39C	diese Arbeit
HEK-293 CEAAIgC-HA	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAAIgC-HA	diese Arbeit
HEK-293 CEAAIgV	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie	Produzieren CEAAIgV	diese Arbeit

#### 2.4.2 Kultivierung und Kryokonservierung von adhärenenten eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung von adhärenenten Zellen erfolgte in der Regel in 10 bis 12 ml Zellkulturmedium (s. Tab. 6, alle Life Technologies) in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (BD

Falcon®) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen bei einem fast durchgehenden Rasen verdünnt und umgesetzt. Für das Umsetzen wurden die Zellen zunächst mit DPBS (Life Technologies) gewaschen und dann entweder mit 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (TE, Life Technologies) (AGS-Zellen) oder 2 mM EDTA (HEK-293; CHO lec 3.2.8.1) für 5 min bei 37 °C abgelöst. Die Reaktion wurde mittels Kulturmedium mit FCS gestoppt, die Zellen verdünnt und mit frischem Medium in eine neue Kulturflasche umgesetzt (für die Verdünnungsfaktoren s. Tab. 6). HEK-293-Zellen wurden in den meisten Fällen nicht behandelt, da sich diese Zellen einfach in frischem Medium vom Boden der Zellkulturflasche abspülen lassen.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen mit einer Konzentration von ca.  $5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium (s. Tab. 6) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen (Thermo Scientific) pipettiert. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Kultivierung von Zellen aus der Kryokonservierung wurden diese bei 37 °C aufgetaut und direkt mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (160 g, 5 min), das Pellet in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelldichte in eine 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

**Tab. 6: Verwendete Zellkulturmedien, Verdünnungsfaktoren und Antibiotikakonzentrationen**

Zelllinie	Zellkulturmedium	Einfriermedium	Verdünnungsfaktor	Antibiotika
AGS	RPMI 10 % FCS	FCS, 10 % DMSO	1:3 bis 1:8	
Cho lec 3.2.8.1	$\alpha$ -MEM 10 % FCS	FCS, 10 % DMSO	1:6 bis 1:8	0,25 mg/ml G418 (PAA), 2 $\mu$ g/ml Puromycin (Sigma-Aldrich))
HEK-293	DMEM 15 % FCS	FCS, 8 % DMSO	1:8 bis 1:15	G418 (PAA) 0,5 mg/ml bis 1 mg/ml

#### 2.4.3 Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen im Fibrastage™ System

Für die Produktion von ausreichend Zellkulturüberstand für die Aufreinigung von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin wurde das Fibrastage™ System (New Brunswick) verwendet. Dieses ermöglicht ein kontinuierliches Wachstum auf einer großen Wachstumsfläche in einem bewegten System und somit eine große Menge an gewünschtem Protein im Zellkulturüberstand.

Es wurden ca.  $4,9 \times 10^7$  Zellen in 500 ml  $\alpha$ -MEM-Medium zum Animpfen einer Fibrastage Zellkulturflasche verwendet. Die Immobilisierung der Zellen erfolgte für 3 h, danach wurde auf das Programm für normales Wachstum umgestellt (s. Tab. 7). Die Kultivierung erfolgte für ca. 40 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle zwei bis drei Tage wurden ein bis zwei *FibraCel*<sup>R</sup> Disks mit einer Pinzette steril entnommen und die



Lebendzellzahl (2.4.4) bestimmt. Alle sieben Tage wurde der Zellkulturüberstand entnommen (zentrifugiert, steriltfiltriert und bei -20 °C gelagert) und die *FibraCel<sup>®</sup> Disks* mit DPBS (Life Technologies) gewaschen und mit neuem Medium versetzt.

**Tab. 7: FibraStage™ Programme für die Immobilisierung und das Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen**

Programm für die Immobilisierung	Wachstumsprogramm
Anhebungsrate: 2 mm/s	Anhebungsrate: 1 mm/s
Haltezeit Oben: 20 s	Haltezeit Oben: 10 s
Abnahmerate: 2 mm/s	Abnahmerate: 1 mm/s
Haltezeit Unten: 0 s	Haltezeit Unten: 10 s

#### 2.4.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer abgeschätzt. Dafür wurden adhärenente Zellen zunächst in Lösung gebracht (s. 2.4.2), mit Trypanblau-Lösung (Life Technologies), die nur in tote Zellen eindringen kann, 1:10 verdünnt und 10 µl dieser Suspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die nicht blau gefärbten Zellen (lebend) in 4 Großquadranten wurden mikroskopisch ausgezählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter wird berechnet, indem der Mittelwert mit 10 (Verdünnungsfaktor) und 10.000 (Neubauerzählkammerfaktor) multipliziert wird.

## 2.5 Transfektion von HEK-293-Zellen

Die Transfektion wurde mit Hilfe von Lipofectamin®2000-Reagenz (Life Technologies) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit DPBS (Life Technologies) gewaschen, mit Kulturmedium überschichtet und für 24 h kultiviert. Experimente wurden entweder 24 h oder 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Stabile Zelllinien wurden generiert, indem 24 h nach der Transfektion Antibiotikum (G418 1 mg/ml, PAA) zur Selektion dem Kulturmedium beigelegt wurde. Die Produktion der Zielproteine wurde entweder im Western-Blot (2.7.3) oder durchflusscytometrisch (2.10, 2.11) kontrolliert.

## 2.6 Arbeiten mit DNA

### 2.6.1 Oligonukleotide und Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (s. Tab. 8) und die Plasmide (Tab. 9) aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers bezogen.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
LH71	<b>CCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGC</b> <b>TGCAGGTCTCTCAGCTGGGGCCAC</b>	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Insertion eines <b>HA-tags</b> in CEA
LH72	<b>ATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGG</b> <b>GATAAGGAGAAGTTCCAGATGCAG</b>	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Insertion eines <b>HA-tags</b> in CEA
LH73	<b>ATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGG</b> <b>GATAGGGCTTGGGCAGCTCCGCAGAGACT</b> <b>GTGATTGTC</b>	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Deletion der A3-B3-Domänen und Insertion eines <b>HA-tags</b> in CEA
LH74	<b>ATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGG</b> <b>GATAGGGTTTGGGTGGCTCTGCATAG</b>	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Deletion der A2-B3 Domänen und Insertion eines <b>HA-tags</b> in CEA
LH75	<b>ATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGG</b> <b>GATAGGGCTTGGGCAGCTCCGGGTATAC</b>	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Deletion der IgC-Domänen und Insertion eines <b>HA-tags</b> in CEA
LH76	ATGCAGAGCCACCCAAACCCT	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Sequenzierung von CEA
LH77	TCCGCAGAGACTGTGATTGTCTT	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Sequenzierung von CEA
LH79	TTCCGGGTATACCCGGAG	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Deletion der IgV-Domäne in CEA, 5'-Phosphat
LH81	GATCA <b>AGCTT</b> CATGGAGTCTCCCTCGG	<i>sense</i> Oligonukleotid mit <b>HindIII</b> -Schnittstelle zur Amplifikation von CEA
LH82	GACTGTGATGCTCTTGACTA	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Amplifikation von CEA
LH89	GAGCTTGGCAGTGGTGG	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Deletion der IgV-Domäne in CEA, 5'-Phosphat
LH90	GCATCTGGA <b>ACTTCTCCTGGTCTCTC</b>	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Deletion der IgC-Domänen in CEA, 5'-Phosphat
LH91	GTATACCCGGA <b>ACTGGCCAG</b>	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Deletion der IgC-Domänen in CEA, 5'-Phosphat
LH93	GATCTCTAG <b>ATTAT</b> CTTCCAGTTTTGGCA AGGAGC	<i>antisense</i> Oligonukleotid mit <b>XbaI</b> -Schnittstelle und <b>Stop-Codon</b> zur Amplifikation der Transmembrandomäne von CEACAM3
LH94	<b>CCAGTTCCGGGTATACGAAAATGCCCA</b> <b>GGCCTTCC</b>	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Amplifikation der Transmembrandomäne von CEACAM3; am 5' Ende komplementär zu <b>CEA IgV</b>
LH95	TATAATTAGACTGTTGCCATCCACTC	<i>antisense</i> Oligonukleotid für die Insertion der Mutationen <b>R43S Q44L</b> in CEA, 5'-Phosphat

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
LH96	GGATATGTAATAGGAACTCAACAAGC	sense Oligonukleotid für Insertion der Mutation V39C bzw. R43S und Q44L in CEA , 5'-Phosphat
LH97	TATAATTTGACGGTTGCCATCACATCTTTC ACC	antisense Oligonukleotid für die Insertion der Mutation <b>V39C</b> in CEA, 5'-Phosphat

**Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Name	Eigenschaften	verwendete Oligonukleotide	Referenz
pCDNA3 CEACAM3 (#225)	Expressionsplasmid für CEACAM3		(Muenzner <i>et al.</i> 2008)
pHel4-GFP	Expressionsplasmid für GFP in <i>H. pylori</i>		AG R. Haas MvP
pLH35 (pRc/CMV_CEA-HA)	Expressionsplasmid für CEA-HA	LH71, LH72	diese Arbeit
pLH36 (pRc/CMV_CEAΔA3-B3-HA)	Expressionsplasmid für CEAΔA3-B3-HA	LH71, LH73	diese Arbeit
pLH37 (pRc/CMV_CEAΔA2-B3-HA)	Expressionsplasmid für CEAΔA2-B3-HA	LH71, LH74	diese Arbeit
pLH38 (pRc/CMV_CEAΔIgC-HA)	Expressionsplasmid für CEAΔIgC-HA	LH 71, LH75	diese Arbeit
pLH45 (pRc/CMV_CEAΔIgC)	Expressionsplasmid für CEAΔIgC	LH90, LH91	diese Arbeit
pLH46 (pRc/CMV_CEAΔIgV)	Expressionsplasmid für CEAΔIgV	LH79, LH89	diese Arbeit
pLH48 (pRc/CMV_CEA-N/3-TM)	Expressionsplasmid für CEA-N/3-TM	LH81, LH82, LH93, LH94	diese Arbeit
pLH49 (pRc/CMV_CEA R43S Q44L)	Expressionsplasmid für CEA R43S Q44L	LH95, LH96	diese Arbeit
pLH50 (pRc/CMV_CEAΔIgC R43S Q44L)	Expressionsplasmid für CEAΔIgC R43S Q44L	LH95, LH96	diese Arbeit
pLH51 (pRc/CMV_CEA V39C)	Expressionsplasmid für CEA V39C	LH96, LH97	diese Arbeit

Name	Eigenschaften	verwendete Oligonukleotide	Referenz
pLH52 (pRc/CMV_CEAΔIgC V39C)	Expressionsplasmid für CEAΔIgC V39C	LH96, LH97	diese Arbeit
pLH53 (pLPS-3'EGFP_CEA-NT R43S Q44L)	Expressionsplasmid für lösliches CEA R43S Q44L-N-GFP	LH95, LH96	diese Arbeit
pLH54 (pLPS-3'EGFP_CEA-NT V39C)	Expressionsplasmid für lösliches CEA V39C-N-GFP	LH96, LH97	diese Arbeit
pRc/CMV	Expressionsplasmid; SV40 <i>ori</i> , ColE1 <i>ori</i> , F1 <i>ori</i> , CMV Promotor, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , PT7		Life Technologies
pLPS-3'EGFP_CEA-NT (#751)	Expressionsplasmid für lösliches und sekretiertes CEA-N-GFP		Kuespert <i>et al.</i> (2007)
pGEX-4T3_GST-Syn4 (pPR63 )	Expressionsplasmid für GST-Syndecan-4 unter Kontrolle des <i>tac</i> Promotors, Amp <sup>R</sup>		Patricia Rousselle (Carulli <i>et al.</i> 2012)
pGEX-4T3	bakterielles Expressionsplasmid für GST- <i>tag</i> Fusionsproteine unter der Kontrolle des <i>tac</i> Promotors, Amp <sup>R</sup>		GE Healthcare
pRc/CMV-CEA	Expressionsplasmid für CEA		W. Zimmermann, LMU
pRc/CMV-CEACAM1-4L	Expressionsplasmid für CEACAM1-4L		W. Zimmermann, LMU
pRc/CMV-CEACAM4	Expressionsplasmid für CEACAM4		W. Zimmermann, LMU
pRc/CMV-CEACAM6	Expressionsplasmid für CEACAM6		W. Zimmermann, LMU
pRc/CMV-CEACAM7-2	Expressionsplasmid für CEACAM7-2		W. Zimmermann, LMU
pRc/CMV-CEACAM8	Expressionsplasmid für CEACAM8		W. Zimmermann, LMU
pVK5	Plasmid für die Deletion von <i>sabB</i>		Verena Königer
pVK13	Plasmid für die Deletion von <i>hopQ</i>		Königer, Holsten <i>et al.</i> (Manuskript in Vorbereitung)

### 2.6.2 Isolierung von DNA aus *E. coli* und *H. pylori*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach Anweisungen des Herstellers. Für *H. pylori* wurde das Wizard™ Plus SV Miniprep Kit von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Chromosomale DNA aus *H. pylori* wurde mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit der Firma QIAGEN extrahiert. Hierfür wurden Bakterien von einer Übernachtskultur in PBS gelöst und anschließend sedimentiert (13.100 g, 1 min). Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers (QIAGEN).

### 2.6.3 Restriktion von DNA

Die enzymatische Hydrolyse von DNA erfolgte nach Anweisungen der Hersteller (Roche, Thermo Scientific, NEB). Für eine präparative Restriktion wurde ca. 1 bis 2 µg DNA eingesetzt und für eine analytische Restriktion ca. 30 bis 100 ng. Die enzymatische Reaktion erfolgte in der Regel bei 37 °C für vier Stunden (Ausnahme *DpnI* Hydrolyse 1 h). Eine Inaktivierung der Enzyme wurde durchgeführt, wenn direkt auf die Restriktion eine Ligation (2.6.7) erfolgte (Ausnahme *DpnI*). Andernfalls wurde die hydrolysierte DNA entweder direkt oder über ein Agarosegel aufgereinigt (2.6.4, 2.6.6).

### 2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um DNA ihrer Länge nach aufzutrennen. Dafür wurde 1-2 % Agarose (Sigma-Aldrich) in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) aufgekocht und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach der Aushärtung des Agarosegels wurde TAE-Puffer in die Kammer gefüllt und die DNA-Proben, die mit GEBS-Puffer (20 % (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosyl) versetzt waren, in die Taschen pipettiert. Es wurde für 50 bis 70 min eine Spannung von 70 V angelegt, wodurch die negativ geladene DNA in Richtung des Pluspols gezogen wird. Dabei werden kleinere DNA-Fragmente weniger von dem Agarosenetzwerk zurückgehalten als größere. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit dem DNA-interkalierenden Stoff Ethidiumbromid (1 mg/l, Sigma-Aldrich) für ca. 20 min gefärbt. Die angefärbte DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad). Anhand eines Größenstandards (Generuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific) kann dann die Länge der DNA-Proben abgeschätzt werden. Im Falle einer präparativen Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend aufgereinigt (2.6.6).

### 2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und inverse PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. In dieser Arbeit wurde sie eingesetzt, um Restriktionsschnittstellen an DNA-Fragmente anzufügen, zur

Überprüfung von Deletionen im Chromosom von *H. pylori*, sowie für die Entfernung von CEA-Domänen in Plasmiden.

Die Temperatur für die Anlagerung der *Primer* wurde anhand ihrer Schmelztemperatur mit den web-basierten Programmen *OligoCalc* oder *Tm calculator* bestimmt.

Eine inverse PCR wurde angewandt, um bestimmte Bereiche eines Plasmides zu entfernen. Hierbei liegt der *sense Primer* in 5'-3' Richtung hinter dem *antisense Primer* und somit wird das ganze Plasmid amplifiziert, mit Ausnahme des Bereiches zwischen dem *antisense* und dem *sense Primer*. Die *Primer* sind am 5'-Ende phosphoryliert, damit die aus der PCR entstandene lineare DNA zu einem zirkulären Plasmid ligiert werden kann. Die DNA-Vorlage wurde vor der Ligation, direkt nach der Vervielfältigung, mit einem speziellen Restriktionsenzym (*DpnI*, 2.6.3), das die Methylierungsmuster der DNA-Vorlage erkennt, hydrolysiert.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 10) sind alle in dieser Arbeit verwendeten DNA-Polymerasen und deren Anwendung aufgelistet. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ergab sich aus dem Angaben des Herstellers.

**Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete DNA-Polymerasen und deren Anwendung**

Name	Anwendung	PCR-Programm
PANScript (pan-biotech)	Überprüfung von Klonierungen	Denaturierung: 94 °C bis 96 °C Elongation: 68 °C bis 72 °C 1 kb/min Zyklen: 35
TAKARA (TAKARA BIO INC.)	Klonierungen	Denaturierung: 94 °C bis 96 °C Elongation: 68 °C 1-2 kb/min Zyklen: 34
Phusion (Thermo Scientific)	Inverse PCR	Denaturierung: 98 °C Elongation: 72 °C 2-4 kb/min Zyklen: 20-24

#### 2.6.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder aus enzymatischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe des illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare) nach Anweisungen des Herstellers.

#### 2.6.7 Ligation von DNA

Ligationen wurden mit der T4-Ligase von Roche bei 4 °C über Nacht oder 1 bis 6 h bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und DNA-Fragment betrug 1:2 bis 1:5.

Für die Deletion von CEA-Domänen mittels inverser PCR (2.6.5) wurde die Ligation direkt nach der Hydrolyse mit *DpnI* ohne Aufreinigung der DNA durchgeführt.

Für die Transformation von *E. coli* (2.3.4) wurden 3 µl (inverse PCR) bis 20 µl des Ligationsansatzes verwendet.

#### 2.6.8 Sequenzierung von DNA

Die DNA wurde nach dem Klonieren auf ihre Richtigkeit mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech überprüft. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Programm CLC Workbench 6 analysiert.

#### 2.6.9 *In silico* Klonierungen

Die Klonierungen wurden zunächst *in silico* mit Hilfe des Programmes CLC DNA Workbench 6 durchgeführt. Des Weiteren wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Protein-Alignments mit diesem Programm erstellt.

### 2.7 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Es wurden 10 µl der zu testenden Probe, bzw. BSA (Biomol) als Standard, in verschiedenen Konzentrationen mit 190 µl Bradford-Reagenz (0,01 % Coomassie Brilliant Blue G250, 5 % Ethanol, 10 % Phosphorsäure (85 %ig)) in flachboden-96-Napfplatten (Costa) vermischt. Nach einer Inkubation von ca. 10 min im Dunkeln wurde die Extinktion bei 595 nm im Plattenphotometer (Tecan) gemessen. Der Leerwert wurde subtrahiert und die Proteinkonzentration anhand der BSA Eichkurve berechnet.

Die Extinktion von gereinigten Proteinen wurde gegen den entsprechenden Leerwert bei einer Wellenlänge von 280 nm im NanoDrop (PeqLab) gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beer'sches Gesetzes und dem proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  kann aus der Extinktion die genaue Stoffmengenkonzentration berechnet werden. Der web-basierte Dienst *Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt aus der Aminosäuresequenz des Proteins den entsprechenden Extinktionskoeffizienten. Für Proben, die aus einem komplexen Proteingemisch bestehen eignet sich diese Methode nicht.

#### 2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, basierend auf Laemmli (Laemmli 1970), dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden entweder diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele, mit Sammel- und Trenngel (Sambrook J. 2001), oder Gele ohne Sammelgel nach Ahn 2001 (Ahn *et al.* 2001) hergestellt. Die molekulare Masse der zu untersuchenden Proteine bestimmte die Acrylamidkonzentration der Trenngele, die von

6 %-15 % variierte wohin gegen Sammelgele immer 5 %ig angesetzt wurden. Es wurden 1 µl bis 20 µl Proteinproben aufgetragen, die vorher mit zweifach konzentriertem Ladepuffer (100 mM Tris/HCl, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin; z.T. 10 % β-Mercaptoethanol) verdünnt und 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht wurden. Zur Abschätzung der molekularen Masse wurde ein Proteinstandard (PageRuler prestained, Fermentas; XXL DeLuxe, GeneON) mitgeführt. Die Gelelektrophorese wurde in *Mini-PROTEAN® Tetra Cells* der Firma Bio-Rad mit SDS-Laufpuffer (250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS; 25 mM Tris/HCl pH 8,3) bei einer elektrischen Spannung von 80-120 V für ca. 120 min durchgeführt. Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte entweder durch die Färbung mit Coomassie-Blau (Färbelösung: 7,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 7,5 % (v/v) Essigsäure, 10 % Ethanol (v/v), 10 % Methanol (v/v); Entfärbelösung: 10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Essigsäure) (Marshall und Williams 1992) oder die Proteine wurden zur immunologischen Analyse auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (s. 2.7.3).

### 2.7.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran (Western-Blot)

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt (siehe 2.7.2) und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte nach dem *semi-dry* Verfahren, wobei zwischen zwei Graphitplatten senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld aufgebaut wird (Towbin *et al.* 1992). Zur Gewährleistung des Stromflusses werden dicke und dünne Filterpapiere (Whatman) in Western Transfer Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, 0,1 % SDS, pH 8,3) getränkt und die PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Der Apparaturaufbau war wie folgt: Anode, je zwei dicke und dünne Filterpapiere, PVDF-Membran, Polyacrylamidgel gefolgt von je zwei dünnen und dicken Filterpapieren und der Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei 1,25 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 75 min.

Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran zunächst für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 3 % BSA in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) abgesättigt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Danach wurde die Membran mit primärem Antikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, in TBS-Tween (Tween20; 0,075 %) für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach vier zehnminütigen Waschschritten mit TBS-Tween erfolgte eine einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und an dem entweder eine alkalische Phosphatase oder eine Peroxidase gekoppelt ist. Vor der Detektion der Proteine wurden erneut vier zehnminütige Waschschrritte mit TBS-Tween durchgeführt.

Der Nachweis von alkalischer Phosphatase und somit des zu untersuchenden Proteins auf der Trägermembran wurde in 10 ml Detektionslösung (0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1 g/l NBT, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mg/l BCIP) unter Schwenken durchgeführt. Die alkalische



Phosphatase katalysiert eine Farbreaktion auf der Membran wodurch die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt.

Der Nachweis mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion (Immobilon Western, Millipore), die sehr sensitiv ist und die quantitativ gemessen werden kann. Die enzymatische Reaktion auf der Membran wurde mit dem ChemiDoc MP Gerät (Bio-Rad) dokumentiert und anschließend mit der Software Image Lab (Bio-Rad) analysiert.

Die Membran kann im Falle der Chemilumineszenzreaktion wieder verwendet werden, in dem sie 30 bis 60 min mit einer sauren Lösung (25 mM Glycin-HCl, pH 2, 1 % SDS) behandelt wird, die die Antikörperkomplexe entfernt. Bevor weitere Proteine mit anderen Antikörpern markiert werden können, muss die Membran zweimal gewaschen und erneut abgesättigt werden.

#### 2.7.4 Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 11) sind alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper und ihr Verwendungszweck aufgelistet.

**Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Beschreibung	Anwendung
$\alpha$ CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Teil von CagA (Kaninchen)	Western-Blot: 1:5000
$\alpha$ CagA (AK268)	Polyklonales Antiserum gegen den N-terminalen Teil von CagA (Kaninchen)	Western-Blot: 1:2000
$\alpha$ CagA (AK299)	Polyklonales Antiserum gegen EPIYA-Peptid von CagA	Western-Blot: 1:1000
$\alpha$ CEA (26/3/13)	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CEA (Maus), Aldevron	Durchflusscytometrie: 1,2 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen
$\alpha$ CEACAM1 (GM-8G5)	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CEACAM1 (Maus), Aldevron	Durchflusscytometrie: 1,2 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen
$\alpha$ CEACAM7 (Cac <sub>2</sub> )	Polyklonales Antiserum aus der Maus (Thompson <i>et al.</i> 1997)	Durchflusscytometrie: 1:25
$\alpha$ CEACAM8 (LT-3AG-B2)	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CEACAM8 (Maus), Aldevron / W. Zimmermann	Durchflusscytometrie: 1,2 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen
$\alpha$ CEACAM-Pan (D14HD11)	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CEACAM 1,3,4,5,6 (Maus), Aldevron	Durchflusscytometrie: 1,2 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen
$\alpha$ GFP (JL-8)	Monoklonaler Antikörper gegen grünfluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i> (Maus), Clontech Laboratories	Western-Blot: 1:2000

Antikörper	Beschreibung	Anwendung
$\alpha$ GST (GST-2)	Monoklonaler Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase (Maus), Sigma-Aldrich	Western-Blot: 1:50.000
$\alpha$ HA (HA-7)	Monoklonaler Antikörper gegen das Hämagglutinin (HA)-Epitop (Maus), Sigma-Aldrich	Durchflusscytometrie und Western-Blot: 1:10.000
$\alpha$ His-tag (6G2A9)	Monoklonaler Antikörper gegen His-tag (Maus), antibodies-online	Western-Blot: 1:10.000
$\alpha$ HopQ (AK298)	Polyklonales Antiserum (Kaninchen) gegen HopQ (synthetisches <i>H. pylori</i> P12 Peptid: SKGERLEAHVTTSKYQC)	Western-Blot: 1:1000
$\alpha$ P-Tyr (4G10)	Monoklonaler Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus), Merck Millipore	Western-Blot: 1:10.000
$\alpha$ RecA (AK263)	Polyklonales Antiserum gegen ein RecA-Fusionsprotein (Kaninchen)	Western-Blot: 1:1000
$\alpha$ SabA (AK278)	Polyklonales Antiserum gegen ein SabA-Fusionsprotein (Kaninchen)	Western-Blot: 1:10.000
$\alpha$ SYND4 (5g9)	Monoklonaler Antikörper gegen humanes Syndecan-4 (Maus), Santa Cruz Biotechnology	Western-Blot: 1:1000
$\alpha$ Tubulin (ab56676)	Monoklonaler Antikörper gegen Tubulin (Maus), abcam	Western-Blot: 1:50.000

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 12) sind alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper und ihre Anwendung aufgelistet.

**Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper**

Sekundäre Antikörper	Beschreibung	Anwendung
$\alpha$ Maus IgG-POX	Peroxidase (POX) gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege), Sigma-Aldrich	Western-Blot: 1:50.000
$\alpha$ Kaninchen IgG-POX	Peroxidase (POX) gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege), Sigma-Aldrich	Western-Blot: 1:10.000
$\alpha$ Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen), Sigma-Aldrich	Western-Blot: 1:5000

Sekundäre Antikörper	Beschreibung	Anwendung
$\alpha$ -Maus IgG-Alexa488	Alexa-Fluor488-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen Maus-IgG, Life Technologies	Durchflusscytometrie: 1:2500

### 2.7.5 Herstellung von Bakterien- und Zelllysaten

Zunächst wurde eine definierte Anzahl an Zellen (bei Bakterien mittels OD bestimmt s. 2.2.4) mittels Zentrifugation sedimentiert (Bakterien: 1500 g, 5 min; Zellen 16.100 g, 1 min). Das Pellet wurde in einer definierten Menge (beispielsweise  $6 \times 10^7$  Bakterien in 20  $\mu$ l) PBS (Bakterien) oder RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl, 125 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40 (v/v), 6 mM Na-Deoxycholsäure; Zellen) resuspendiert und mit zweifach konzentriertem SDS-Ladepuffer (2.7.2) versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 98 °C aufgekocht und konnten anschließend mittels SDS-PAGE (2.7.2) oder Western-Blot (2.7.3) analysiert werden.

### 2.7.6 Proteinfällung aus Zellkulturüberständen

Für eine Analyse der Proteine im Zellkulturüberstand mussten die Proteine vor dem Western-Blot gefällt werden. Dafür wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand mit 9 ml eiskaltem Ethanol (reinst PA, Roth) vermischt und 2-4 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Proteine (40 min, 4 °C, 15.000 g) gefolgt von einem Waschschrift (3 ml 90 % eiskalter Ethanol). Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet getrocknet, in PBS gelöst und mit zweifach konzentriertem SDS-Ladepuffer (2.7.2) versetzt.

### 2.7.7 Markierung von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Das aufgereinigte Heterodimer von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (s. 2.9.3) wurde mit dem AlexaFluor647-Farbstoff markiert. Dafür wurde das Monoclonal Antibody Labeling Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.8 Herstellung von CEA-N-GFP in HEK-293-Zellen (Kuespert *et al.* 2007)

Die Herstellung von CEA-N-GFP wurde wie in Kuespert *et al.* 2007 beschrieben mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Für die Produktion wurden stabil CEA-N-GFP-produzierende HEK-293-Zellen (2.5) verwendet. Bei einem konfluenten Zellrasen in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden die Zellen mit DPBS (Life Technologies) gewaschen und anschließend mit 12 ml Opti-MEM® (Life Technologies) überschichtet. Nach zwei Tagen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde der Überstand abgenommen, mittels Zentrifugation (5 min, 160 g) von Zellen und Zelltrümmer befreit und anschließend steril filtriert

(Millipore, 22 µm Porengröße). Der Zellkulturüberstand wurde in Aliquots bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.9 Produktion von Aufreinigung von Proteinen

### 2.9.1 Heterologe Produktion der Syndecan-4 Ektodomäne

Die Syndecan-4 Ektodomäne wurde in DH5α *E. coli* heterolog produziert. Zur Überprüfung der Herstellung und Aufreinigung wurden stellenweise Proben für eine Analyse mittels SDS-PAGE (2.7.2) genommen. Für die Expression wurden 50 ml LB (mit Ampicillin s. 2.2.1) Übernachtskultur herangezogen und mit 150 ml frischem LB-Medium ohne Antibiotikum verdünnt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bebrütet bis die Bakterien sich in der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> von 0,76) befanden. Anschließend wurde die Expression durch Zugabe von 100 µM IPTG (Roth) induziert. Unmittelbar vor der Induktion (t<sub>0</sub>) wurde ein Bakterienlysats (s. 2.7.4) hergestellt. Nach weiteren 3 h Wachstum wurde die Induktion auf Eis gestoppt (Bakterienlysats, t<sub>e</sub>) und die Bakterien durch Zentrifugation (4 °C, 20 min, 2800 g) sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 8 ml PBS\* (PBS mit 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin) aufgenommen und die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min, 4 °C, 2800 g) um Zelltrümmer von löslichen Proteinen zu trennen. Danach wurde sowohl vom Pellet als auch aus dem Überstand eine Probe entnommen. Da sich Syndecan-4-GST im Überstand befindet wurde das Pellet verworfen.

### 2.9.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Syndecan-4

Die Ektodomäne von Syndecan-4 ist mit einem GST-tag fusioniert und kann somit affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Dafür wurde ca. 1 ml Glutathion Sepharose-Gemisch (GE Healthcare) zweimal mit je 10 ml PBS\* (s. 2.9.1) gewaschen (500g, 5 min, 4 °C). Danach wurde der Überstand aus 2.9.1 (8 ml) auf die Glutathion Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion Sepharose sedimentiert (5 min, 500 g, 4 °C), der Überstand verworfen (nicht gebundene Proteine, DL) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (W1-W3). Syndecan-4-GST wurde proteolytisch so behandelt, dass Syndecan-4 ohne GST eluiert wird. Dazu wurde zur Sepharose in 1 ml PBS das Spaltungsenzym Thrombin (5 U) hinzugegeben und für 2 bis 16 h auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml PBS hinzugefügt und die Sepharose sedimentiert. Im Überstand befindet sich neben der Syndecan-4 Ektodomäne auch das Enzym Thrombin. Dieses wurde entfernt indem der Überstand auf Benzamidin Sepharose, an die nur Thrombin bindet, gegeben wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Sepharose sedimentiert und anschließend dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die jeweils entstandenen Überstände wurden zusammengeführt (ca. 5 ml)

und in einem Amicon 10 K Filter (Millipore) nach Angaben des Herstellers auf ein Volumen von ca. 1 ml eingeengt.

### 2.9.3 Aufreinigung von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinheterodimeren aus Zellkulturüberstand (Takagi *et al.* 2001)

Für die Aufreinigung der Ektodomänen von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin aus Zellkulturüberstand (2.4.3) wurden die Proteine im Zellkulturüberstand gefällt bevor sie durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) anhand ihres His-tags aufgereinigt wurden.

Zuerst wurde der Zellkulturüberstand (s. 2.4.3) unter Rühren bei 4 °C aufgetaut und anschließend mit 300 g/l Ammoniumsulfat (Roth) versetzt, was einer ungefähren Sättigung von 50 % entspricht. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 4 °C (rührend) wurden die gefällten Proteine bei 16.000 g (20 min, 4 °C) sedimentiert. Dieser Schritt dient der Entfernung ungewünschter Proteine, da die  $\alpha 5\beta 1$ -Ektodomänen hier in Lösung bleiben. Nach einer erneuten Zugabe von Ammoniumsulfat (60 g/l, insg. ca. 60 % Sättigung) zu dem Überstand und dreißigminütiger Inkubationszeit wurden die neu gefällten Proteine sedimentiert (16.000 g, 20 min, 4 °C). Das Pellet, das die  $\alpha 5\beta 1$ -Ektodomänen enthält, wurde auf Eis in Puffer A (50 ml/l Zellkulturüberstand, 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) gelöst und dann über Nacht zur Entfernung des Ammoniumsulfats gegen Puffer A dialysiert.

Für die Affinitätschromatographie wurde eine 5 ml His-Trap-Säule (GE Healthcare) und das Äkta explorer (GE Healthcare) Gerät verwendet. Die Säule wurde mit Puffer A gewaschen und äquilibriert bevor die dialysierte Probe mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen wurde. Mit zwei Säulenvolumen Puffer A wurden nicht gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Anschließend wurde mit einem Gradienten von 0-100 % Puffer B (20 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) in 20 min eluiert. Dabei wurden jeweils Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml gesammelt. Zur Überprüfung wurde während der Elution die Absorption der Proteine bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (s. 2.7.2) analysiert, die Fraktionen mit dem meisten  $\alpha 5\beta 1$ -Integrinektodomänen zusammengeführt und mit einem Amicon 100 K Filter (Millipore) auf ein Volumen von ca. 3 ml eingeengt. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen einen Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH8, 300 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) dialysiert.

Für die Aktivierung des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins wurde ein Teil der Proteinlösung mit TEV-Protease (25 µg TEV/1 mg Protein, Sigma) über Nacht bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurde die TEV-Protease mittels Glutathion Sephadex (s. 2.9.2) aus der Probe entfernt.

## 2.10 Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchflusscytometrie

Die Überprüfung der CEACAM Produktion in HEK-293-Zellen erfolgte mittels Durchflusscytometrie (s. 2.10). Hierzu müssen die zu untersuchenden Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

Zunächst wurde die Zellzahl abgeschätzt, dann wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und in DPBS mit 2 % FCS (Life Technologies) von der Wachstums Oberfläche abgespült. Pro Färbung wurden 200.000 Zellen in rundboden-96-Napfplatten (BD) gegeben und für 5 min bei 4 °C mit 160 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 100 µl DPBS mit 2 % FCS und primären Antikörpern (2.7.4) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS 2 % FCS gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem sekundärem Antikörper (in 100 µl) ebenfalls bei 4 °C für 1 h inkubiert. Nach zwei erneuten Waschschritten mit DPBS 2 % FCS erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusscytometer.

Für das Sortieren mittels FACS wurden ca.  $2 \times 10^7$  Zellen angefärbt. Die Mengen der Antikörper wurden entsprechend angepasst. Außerdem erfolgte die Färbung in 3 ml HBBS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Life Technologies) mit 1 % FCS. Zusätzlich erfolgte hier eine Propidiumiodid-Färbung (Life Technologies), um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Dafür wurden die Zellen vor dem Sortieren in HBSS 1 % FCS mit 2,5 µg/ml Propidiumiodid aufgenommen.

## 2.11 Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie ist eine Methode zur Untersuchung einzelner Zellen oder Bakterien auf verschiedene Parameter. Diese Methode wurde in dieser Arbeit für die Überprüfung der Lokalisation von CEACAM auf der Oberfläche von transfizierten HEK-293-Zellen (2.5), die Bindung von Integrin an HEK-293-Zellen (2.13), die Adhärenz von Bakterien an HEK-293-Zellen (2.14.2) sowie für den *Pull-down* von CEA durch *H. pylori* (2.15.1) verwendet. Für all diese Anwendungen wurde zunächst anhand des Vorwärtsstreulichts (FSC; *Forward Scatter*, Maß für das Volumen) und des Seitwärtsstreulichts (SSC; *Side Scatter*, Maß für die Granularität) die Zell- oder Bakterienpopulation eingegrenzt. Danach wurde für jede Probe die Fluoreszenzintensität von 20.000 Ereignissen in der Population aufgezeichnet und daraus die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Als negative Kontrollen wurden nicht gefärbte/infizierte/transfizierte Zellen verwendet, aber auch nur mit sekundärem Antikörper markierte Zellen. Es wurde das Durchflusscytometer CantoII (BD) mit der BD FACSDiva™ Software verwendet und die Daten wurden mit der FLOWJO Software analysiert.

Die stabil transfizierten, CEACAM-produzierenden HEK-293-Zellen wurden mittels FACS sortiert. Die Zellen wurden wie in 2.10 beschrieben angefärbt und anschließend

wurden die Zellen mit CEACAM von denen ohne in einem AriaII FACS (BD) Gerät voneinander getrennt.

## 2.12 Untersuchung der Phospholipase C-Sensitivität von CEA

Proteine, die mittels GPI in der Cytoplasmamembran verankert sind, wie CEA, lassen sich durch das Enzym Phospholipase C von der Membran ablösen. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen in 6-Napfplatten (Corning) ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt des Experiments eine Konfluenz von ca. 80 bis 90 % hatten. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch 500 µl DMEM (Life Technologies) und 500 µl PBS mit 2 % BSA (Biomol) ersetzt. Es wurde 0,2 U Phosphatidyl-inositol-spezifische Phospholipase C (Sigma) hinzugefügt und die Proben bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 40 min inkubiert. Danach erfolgten alle Schritte auf Eis, um die Neubildung von CEA zu verhindern. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS (Life Technologies) gewaschen und in je 1 ml abgespült. Danach wurde das CEA auf der Zelloberfläche angefärbt (2.10) und im Durchflusscytometer untersucht (2.11).

## 2.13 Bestimmung der Bindung von löslichem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinheterodimer an HEK-293-Zellen

Es wurden jeweils 330.000 HEK-293-Zellen in rundboden-96-Napfplatten (BD) gegeben und zweimal mit DPBS gewaschen. Pro Zelllinie wurden dann ca. 0,352 µg mit Alexa647 markiertes  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin (2.7.7) dazugegeben (negative Kontrollen nur DPBS) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS 2 % FCS gewaschen und anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen durchflusscytometrisch (2.11) gemessen.

## 2.14 Infektionsexperimente mit *H. pylori*

### 2.14.1 Bestimmung der CagA-Translokation in eukaryotische Zellen – CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment

Die CagA-Translokation kann indirekt über den Nachweis von phosphoryliertem CagA erfolgen, da dieses nur vorliegt wenn CagA in die Wirtszelle transloziert wurde. Dafür wurden zunächst Zellen in 6-Napfplatten (Corning) 24 h bis 48 h vor der Infektion ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von ca. 80 bis 90 % aufwiesen. Die Bakterien wurden von GC-Agar Platten mit einem Wattestab in sterilem PBS gelöst und die Bakterienanzahl mittels optischer Dichte (s. 2.2.4) bestimmt. Die

Multiplizität der Infektion (MOI; *Multiplicity of Infection*) betrug 60 und die Infektion erfolgte in 1 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS (Life Technologies) für 4 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Für Infektionsexperimente mit Heparin wurde ca. 15 min vor der Infektion 1000 µg/ml Heparin (Sigma-Aldrich) zu den Zellen gegeben. Bei einer Infektion mit Antikörper zur Vernetzung von CEA wurden die Zellen unmittelbar vor Zugabe der Bakterien mit 1,2 µg  $\alpha$  CEA Antikörper (2.7.4) pro 10<sup>6</sup> Zellen versetzt.

Die Infektion wurde auf Eis gestoppt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS\* (PBS mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren: 1 mM PMSF, 1 mM Na-Vanadat, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin) überschichtet. Die infizierten Zellen wurden aus der Platte abgespült (HEK-293) oder mit Zellschabern (BD Falcon®) (AGS) abgeschabt und für 10 min bei 4 °C mit 1500 g zentrifugiert, das Pellet wurde in 20-40 µl PBS\* gelöst. Die Proben wurden mit SDS-Ladepuffer (s. 2.7.2) versetzt und 10 min bei 98 °C aufgekocht. Phosphoryliertes CagA wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.7.2) und anschließend Western-Blot (s. 2.7.3) nachgewiesen.

#### 2.14.2 Bestimmung der Adhärenz von *H. pylori* an HEK-293-Zellen

Die Adhärenz von *H. pylori* an HEK-293-Zellen wurde mittels Durchflussscytometrie bestimmt. Hierfür wurden HEK-293-Zellen grundlegend wie in Abschnitt 2.14.1 beschrieben mit grünfluoreszierenden *H. pylori* (GFP-produzierend) in 12-Napfchalen infiziert. Die Infektionsdauer betrug 1 h (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) bei einer MOI von 60. Danach wurden die Zellen dreimal vorsichtig gewaschen (500 µl PBS 2 % FCS) um nicht adhärenzte *H. pylori* abzuspielen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS 2 % FCS aufgenommen und mittels Durchflussscytometer analysiert (2.10 ). Mit einer nicht infizierten Probe wurde die HEK-293-Zellpopulation und der Autofluoreszenz bestimmt, die anschließend von den Messwerten der anderen Proben subtrahiert wurde. Die infizierten Proben wurden mit den gleichen Parametern gemessen, wobei jeweils 20 000 Ereignisse aufgezeichnet wurden. Die MFI der Proben ist abhängig von der Anzahl der adhärenzten *H. pylori*.

### 2.15 Pull-down-Experimente mit *H. pylori*

#### 2.15.1 *H. pylori* CEA-N-GFP Pull-down-Experiment (Kuespert *et al.* 2007)

Die Bindung zwischen *H. pylori* und CEA-N-GFP bzw. dessen Derivaten wurde mit einem Pull-down-Experiment untersucht. Dazu wurden *H. pylori* von einer Agar-Platte (Übernachtskultur) mit einem sterilen Wattestab abgenommen und eine OD<sub>550</sub> von 0,1 in 1 ml PBS<sup>+</sup> (DPBS, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M CaCl<sub>2</sub>) eingestellt. Aus dieser Suspension wurden 10<sup>6</sup> Bakterien (ca. 33 µl) mit Zellkulturüberstand, der CEA-N-GFP enthält (2.8), vermischt und 30 min unter Rotation (Raumtemperatur) inkubiert. Die verschiedenen Zellkulturüberstände wurden so eingesetzt, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge an



CEA-N-GFP vorhanden war (Western-Blot Analyse, 2.7.3). Nach der Inkubation wurden die Bakterien zentrifugiert (5 min, 16.100 g), zweimal mit 500 µl DPBS<sup>+</sup> gewaschen und final in je 200 µl DPBS 2 % FCS aufgenommen. Anschließend wurde im Durchfluscytometer die mittlere Fluoreszenzintensität der Bakterien gemessen. Nicht mit Überstand behandelte Bakterien dienten als negative Kontrolle.

#### 2.15.2 *H. pylori* Syndecan *Pull-down*-Experiment

Die Bindung zwischen Syndecan und *H. pylori* wurde in einem *Pull-down*-Experiment untersucht. Dazu wurden Bakterien von einer Agar-Platte (Überachtkultur) in BB-Medium resuspendiert und zu einer OD<sub>550</sub> von 0,2 in einem Milliliter verdünnt. Nach der Zugabe von 50 µg Syndecan-4 (von P. Roussel, Lyon, bzw. 2.9.2) wurden die Bakterien 30 min unter Rotation inkubiert, gefolgt von zwei Waschschritten (4.000 g, 10 min, 4 °C) mit PBS. Final wurde das Bakterienpellet in 20 µl PBS gelöst, mit SDS-Ladepuffer versetzt und mittels Western-Blot (2.7.3) gegen Syndecan-4 analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung von *H. pylori* Adhäsinen die mit der CagA-Translokation assoziiert sind

##### 3.1.1 Die äußeren Membranproteine HopQ und SabB und deren Einfluss auf die CagA-Translokation – vorangegangene Arbeiten

*H. pylori* verfügt über eine Vielzahl an äußeren Membranproteinen, die in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Alm *et al.* 2000). Die Hauptgruppe ist die Hop-Familie, zu denen auch die bisher identifizierten Adhäsine zählen. Für drei dieser Adhäsine sind die Rezeptoren bekannt; BabA bindet an Lewis<sup>b</sup> (Ilver *et al.* 1998), die Rezeptoren von SabA sind sialysierte Lewis<sup>x</sup>- und Lewis<sup>a</sup>-Antigene (Mahdavi *et al.* 2002) und LabA (HopD) erkennt die Zuckerstruktur LacdiNAc (Rossez *et al.* 2014). Zwei weitere putative Adhäsine sind die Proteine HopQ und SabB. HopQ ist unter anderem deswegen ein interessantes äußeres Membranprotein, weil es einen Einfluss auf die CagA-Translokation hat (Belogolova *et al.* 2013). Des Weiteren identifizierte Verena Königer im Rahmen ihrer Promotion CEACAMs als Rezeptoren von HopQ (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Mit Hilfe eines *Pull-down*-Experiments (Kuespert *et al.* 2007) (s. 2.15.1) konnte die Bindung von *H. pylori* in Abhängigkeit von HopQ an humanes CEA und CEACAM1 gezeigt werden. Des Weiteren zeigte Claudia Ertl in ihrer Dissertation, dass der Verlust der CagA-Translokation in AGS-Zellen nicht allein von HopQ abhängig ist, sondern von weiteren Adhäsinen (Ertl 2012, Belogolova *et al.* 2013). Dabei identifizierte sie SabB als weiteres potenziell für die CagA-Translokation wichtiges Adhäsın.

##### 3.1.2 Herstellung einer SabB/HopQ-Doppelmutante in *H. pylori* P12 und deren Auswirkung auf die CagA-Translokation

Die Untersuchung einer potenziellen Rolle von SabB bei der Translokation von CagA ist nur möglich, wenn HopQ nicht vorhanden ist, da dieses als beeinflussendes Adhäsın bekannt ist (Belogolova *et al.* 2013). Des Weiteren besitzt *H. pylori* P12 zwei Kopien des SabB-Gens, die beide ausgeschaltet werden müssen, um die Auswirkung der Eliminierung von SabB untersuchen zu können. Die Deletion von mehreren Genen in einem *H. pylori*-Stamm ist durch die Anzahl an verwendbaren Resistenzkassetten limitiert. Dieses Problem wurde umgangen, indem *sabB2* und *hopQ* markerfrei nacheinander durch eine Kontraselektionsmethode (Dailidienne *et al.* 2006, Debowski *et al.* 2012) deletiert wurden (Abb. 3.1, A). Alle Mutationen erfolgten durch homologe Rekombination der flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens. Zunächst wurde von Verena Königer (Max von Pettenkofer-Institut, München) *sabB2* markerfrei

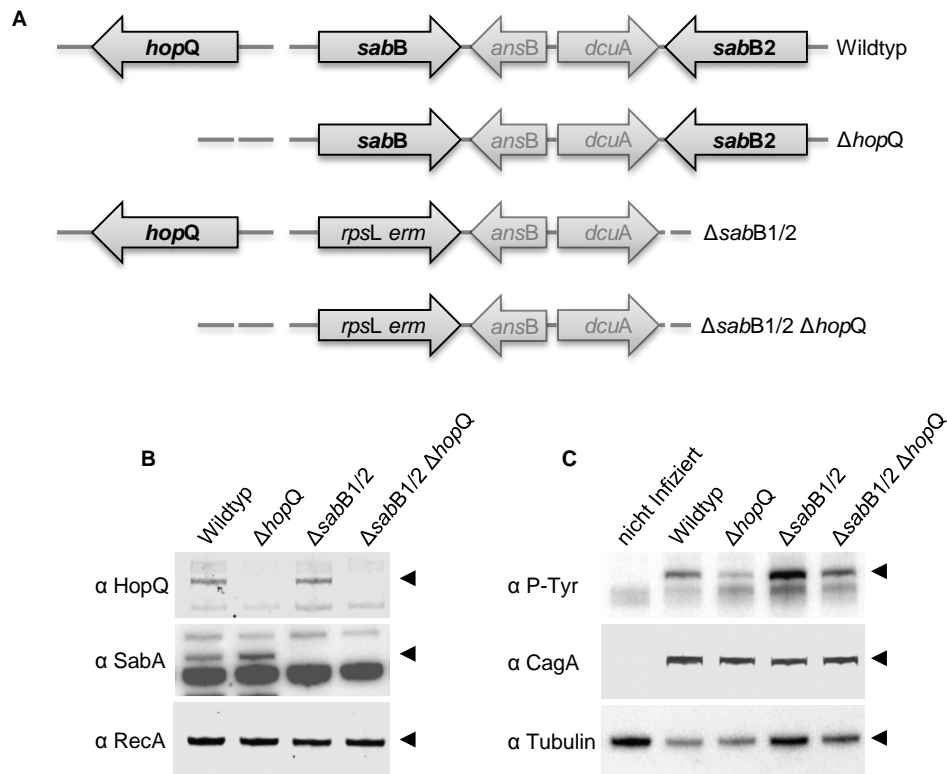
deletiert. Daraufhin erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Transformation des Stammes mit dem Deletionsplasmid pVK13, das *hopQ* deletiert. Die Entfernung von *hopQ* erfolgt durch ein Xer-Rekombinase-System (Debowski *et al.* 2012). Dabei liegen zwei Resistenzkassetten, eine streptomycinsensitivitäts und eine chloramphenicolresistenz Kasette, zwischen zwei Erkennungssequenzen für die Rekombinase (*Dif*-Sequenzen), gefolgt von jeweils den flankierenden Bereichen von HopQ. Das Plasmid codiert zusätzlich außerhalb der ins Chromosom integrierenden Bereiche eine Xer-Rekombinase. Nach der Transformation in einen streptomycinresistenten *H. pylori*-Stamm werden die Resistenzkassetten anstelle von HopQ in das Chromosom rekombiniert. Die erste Selektion findet mit Chloramphenicol statt. Die dadurch erhaltenen Klone werden aber direkt auf Streptomycin passagiert, da die plasmidcodierte Xer-Rekombinase die *Dif*-Sequenzen erkennt und die Resistenzkassetten aus dem Chromosom herausschneidet. Durch die streptomycinsensitivitäts Kasette wird der Selektionsdruck in Richtung Exzision des Genabschnitts zwischen den *Dif*-Sequenzen verschoben. Der so hergestellte markerfreie  $\Delta sabB2 \Delta hopQ$  *H. pylori*-Stamm wurde anschließend mit pVK5 transformiert und auf Erythromycin selektiert. Daraus resultierte der Stamm P12  $\Delta sabB1/2 \Delta hopQ$  (Abb. 3.1, A).

Die SabB1/2-Doppelmutation wurde hergestellt, indem der markerfreie SabB2-Stamm mit chromosomaler DNA des Stamms  $\Delta sabB1/2 \Delta hopQ$  transformiert und anschließend auf Erythromycin selektiert wurde (Abb. 3.1, A). Die HopQ-, SabB- und SabB2-Loci der verschiedenen Stämme sind in Abb. 3.1 A dargestellt.

Die Mutationen wurden mittels PCR (Daten nicht gezeigt) und Western-Blot (Abb. 3.1, B) überprüft. Eine Produktion von HopQ ist nur im Wildtyp und in dem  $\Delta sabB1/2$ -Stamm zu erkennen, wohingegen SabB nur im Wildtyp und dem  $\Delta hopQ$ -Stamm zu detektieren ist, bei jeweils der gleichen Mengen eingesetzten Bakterienlysat (Abb. 3.1, B). Für die Detektion von SabB wurde ein Antiserum, das gegen das Protein SabA gerichtet ist, verwendet. Das Antiserum hat eine Reaktivität gegen SabA aber auch gegen SabB.

Nach der Überprüfung der Stämme auf die Richtigkeit der Deletionen konnte die Auswirkung von SabB auf die CagA-Translokation in AGS-Zellen untersucht werden. Hierfür wurde die CagA-Phosphorylierung des  $\Delta hopQ$ -Stamms mit der des doppelt mutierten  $\Delta sabB1/2 \Delta hopQ$ -Stamms verglichen. Die Infektionsexperimente zeigen, dass die Deletion von *sabB1* und *sabB2* im Vergleich zu der Deletion von *hopQ* allein nicht zu einer Reduktion der CagA-Phosphorylierung führt (Abb. 3.1, C). Des Weiteren ist in Abb. 3.1 C zu erkennen, dass die Deletion von beiden *sabB*-Genen zu einer höheren CagA-Translokation im Vergleich zum Wildtyp führen, diese aber verringert wird, wenn zusätzlich *hopQ* deletiert ist. Diese gesteigerte Translokation des  $\Delta sabB1/2$ -Stamms war jedoch nicht reproduzierbar. In dem gezeigten Experiment ist außerdem die Tubulinmenge bei der Infektion mit  $\Delta sabB1/2$  deutlich höher, als in den anderen infizierten Proben (s. Abb. 3.1, C). Es ist daher davon auszugehen, dass die in diesem Experiment auftretende gesteigerte CagA-Translokation nicht an der Deletion von *sabB1/2* liegt, sondern an einer, im Vergleich zu den anderen Proben, höheren Anzahl

von AGS-Zellen. Die Beteiligung von SabB als Adhäsion an der Translokation von CagA in AGS-Zellen ist aufgrund dieser Ergebnisse unwahrscheinlich.



**Abb. 3.1: SabB/HopQ-Doppelmutation in *H. pylori* P12.**

(A) Schematische Darstellung der *HopQ*- und *SabB*-Loci auf dem Chromosom von P12 Wildtyp und den verschiedenen *hopQ* *sabB* Deletionsmutationen. *HopQ* und *SabB2* wurden markerfrei entfernt und *sabB* wurde gegen eine streptomycinsensitivitäts und erythromycinresistenz Kasette ausgetauscht. (B) Bestätigung der Eliminierung von *HopQ* und *SabB* mittels Western-Blot. Bakterienlysate des Wildtyps, der Stämme  $\Delta hopQ$ ,  $\Delta sabB1/2$  und  $\Delta sabB1/2 \Delta hopQ$  von P12 wurden mit den Antikörpern gegen *HopQ* (1:2000) und gegen *SabA* (1:10.000; detektiert auch *SabB*) auf die Produktion und somit richtige Deletion der Gene untersucht. Als Ladekontrolle wurde *RecA* verwendet. Die Pfeilspitzen zeigen die jeweiligen Proteinbanden an. (C) CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit dem Wildtyp und den Stämmen  $\Delta hopQ$ ,  $\Delta sabB1/2$  und  $\Delta sabB1/2 \Delta hopQ$  von P12. AGS-Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 4 h infiziert, lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Dabei wurde phosphoryliertes CagA (4G10, 1:10.000) und das gesamte CagA (AK268, 1:2000) detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle diente die Detektion des gesamten Tubulins der Proben (1:50.000). Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.2 Syndecane als potenzielle Rezeptoren von *H. pylori*

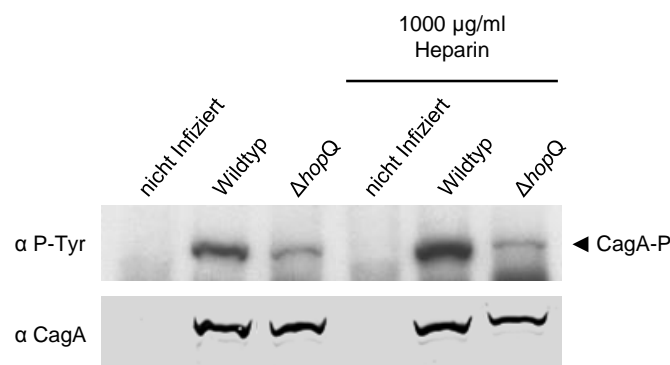
Syndecane sind Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), bestehen also aus einem kleinen Anteil Protein, der in der Cytoplasmamembran verankert ist und einem großen Anteil an Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten, Heparansulfat-GAGs und Chondroitin-GAGs. Syndecane interagieren mit einer Reihe von Proteinen und haben verschiedenste Funktionen, dienen aber auch als Rezeptoren für Bakterien, wie beispielsweise für *Neisserien* (van Putten und Paul 1995, de Vries *et al.* 1998) oder *Staphylococcus aureus*

(Liang *et al.* 1992). Bei einer *H. pylori*-Infektion von gastrischen Epithelzelllinien wird in Abhängigkeit von der *cag*-Pathogenitätsinsel Syndecan-4 hoch reguliert (Smith *et al.* 2006, Magalhaes *et al.* 2009). Des Weiteren wurde beschrieben, dass *H. pylori* an HSPGs binden kann (Guzman-Murillo *et al.* 2001). Deshalb stellte sich die Frage, ob die Bindung von *H. pylori* an Syndecan-4 die CagA-Translokation positiv beeinflusst. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde untersucht, ob Heparin einen Einfluss auf die CagA-Translokation in AGS-Zellen hat (s. 3.2.1) und ob *H. pylori* an den Proteinanteil oder an die Zuckerstruktur von Syndecan-4 bindet (s. 3.2.2).

### 3.2.1 Einfluss von Heparin auf die CagA-Translokation

Heparin kann als Inhibitor zwischen Heparansulfaten und Rezeptoren wirken, indem es mit Heparansulfat um Bindestellen konkurriert. So führt beispielsweise die Zugabe von Heparin zu Infektionsexperimenten mit *Y. enterocolitica* zu einer verminderten Adhärenz an die Zellen gefolgt von einer Reduktion der Translokation von Effektoproteinen (Boyd *et al.* 1998). Da HopQ ein Adhäsion ist, das die CagA-Translokation von *H. pylori* beeinflusst, kann eine Aussage, ob Heparin die CagA-Translokation ebenfalls beeinträchtigt, nur getroffen werden, wenn HopQ nicht auf der Oberfläche der Bakterienzellen vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden AGS-Zellen, die mit Heparin behandelt wurden, mit P12-Wildtyp bzw. der P12 $\Delta$ hopQ-Mutante infiziert.

Die Infektionsexperimente mit *H. pylori* P12-Wildtyp und P12 $\Delta$ hopQ zeigen, dass Heparin keinen Einfluss auf die CagA-Translokation hat (Abb. 3.2). Die CagA-Translokation wird mit Heparin selbst bei dem  $\Delta$ hopQ-Stamm nicht vollständig gehemmt.



**Abb. 3.2: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit Heparin.**

AGS-Zellen wurden 15 min vor der Infektion mit P12-Wildtyp und  $\Delta$ hopQ (4 h, MOI 60) mit 1000 µg/ml Heparin behandelt. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt und im Western-Blot analysiert. Zur Detektion von phosphoryliertem CagA (CagA-P) und CagA wurden die spezifischen Antikörper 4G10 (P-Tyr) und AK257 (CagA) verwendet.

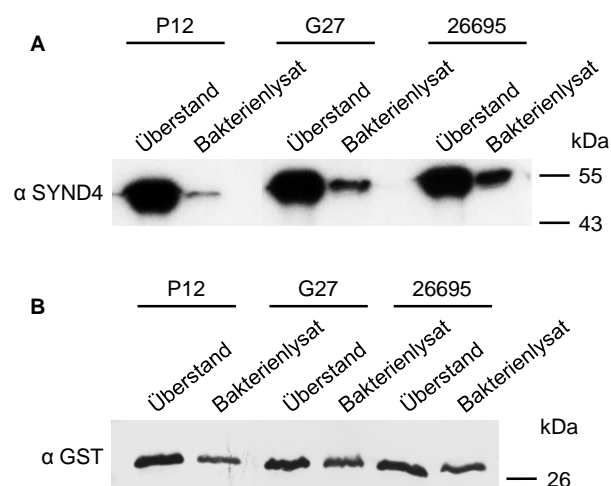
Das Signal der Proteinbande des phosphorylierten CagA ist beim Wildtyp mit Heparin stärker als beim Wildtyp ohne Heparin (Abb. 3.2). Diese Beobachtung konnte in den Wiederholungen des Experiments aber nicht bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Eine indirekte Beteiligung von heparansulfatbindenden Adhäsinen an der CagA-Translokation in Abwesenheit der HopQ-CEACAM-Interaktion in AGS-Zellen ist aufgrund dieser Ergebnisse unwahrscheinlich.

### 3.2.2 Untersuchung einer potenziellen Interaktion zwischen der Ektodomäne von Syndecan-4 und *H. pylori*

Eine potenzielle Interaktion zwischen dem extrazellulären Proteinanteil von Syndecan-4 und *H. pylori* sollte durch ein *Pull-down*-Experiment analysiert werden. Dazu wurden verschiedene *H. pylori*-Stämme mit dem aufgereinigten Syndecan-4-Ektodomäne-Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein (GST-hS4ED) oder nur GST als Kontrolle aus dem Labor von P. Rousselle (Lyon, Frankreich) inkubiert (Carulli *et al.* 2012). Danach wurde mittels Western-Blot analysiert, ob GST-hS4ED an den Bakterien gebunden aus der Lösung präzipitiert werden konnte (2.15.2).

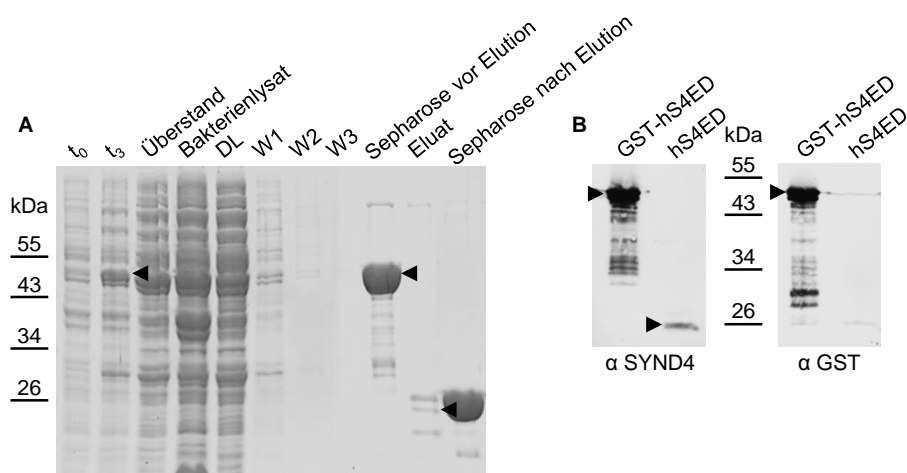
In Abb. 3.3 A ist der Western-Blot des *Pull-down*-Experiments dargestellt. Sowohl im Überstand als auch im Bakterienlysat ist Syndecan-4 mit einer ungefähren Größe von 55 kDa zu sehen. Ein großer Anteil des eingesetzten Proteins bleibt in Lösung (Überstand), während nur ein kleiner Teil GST-hS4ED an den Bakterien gebunden ist und somit mit ihnen präzipitiert wurde (Bakterienlysat; Abb. 3.3, A). Das bedeutet, dass *H. pylori* an GST-hS4ED binden kann. Um auszuschließen, dass *H. pylori* mit GST statt der Ektodomäne von Syndecan-4 (SYND4-ED) interagiert, wurde das Experiment mit GST alleine ohne hS4ED durchgeführt (Abb. 3.3, B). In diesem Kontrollexperiment ist GST mit einer Größe von ca. 26 kDa im Bakterienlysat zu erkennen, daher ist nicht auszuschließen, dass *H. pylori* nur an GST anstatt an Syndecan-4 bindet.



**Abb. 3.3: *Pull-down*-Experiment mit *H. pylori* und GST-Syndecan-4.**

Die *H. pylori*-Stämme P12, G27 und 26695 wurden mit (A) GST-hS4ED (Ektodomäne von Syndecan-4 an GST fusioniert) oder (B) nur GST inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden Bakterienlysate und Proben aus dem Überstand angefertigt und diese im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Syndecan-4 (α SYND4) (A) bzw. gegen GST (B) analysiert.

Die Ektodomäne (hS4ED) kann proteolytisch von dem GST-tag getrennt werden. Somit kann das *Pull-down*-Experiment ohne GST-tag durchgeführt werden. Dazu wurde GST-hS4ED zunächst in *E. coli* hergestellt. Die Produktion des Proteins ist in der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE deutlich zu erkennen (Abb. 3.4, A, Pfeilspitze). Die Bakterien wurden anschließend aufgeschlossen und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Dabei ist zu sehen, dass GST-hS4ED im Überstand verbleibt und nur zu geringen Teilen mit den Zelltrümmern zusammen sedimentiert (Abb. 3.4, A, Überstand und Bakterienlysat). Nach Inkubation des Überstands mit Glutathion-Sepharose und mehreren Waschschritten ist zu erkennen, dass GST-hS4ED an das Säulenmaterial gebunden ist (Abb. 3.4, A, DL, W1-W3, Sepharose vor Elution). Die Elution von hS4ED erfolgte durch das proteolytische Enzym Thrombin, das spezifisch den Bereich zwischen dem GST-tag und der hS4ED erkennt. Dadurch bleibt der GST-tag an der Sepharose hängen und hS4ED wird eluiert (Abb. 3.4, A, Eluat, Sepharose nach Elution). Zur Überprüfung der vollständigen Proteolyse wurde GST-hS4ED und hS4ED im Western-Blot mit Antikörpern spezifisch gegen GST bzw. Syndecan-4 analysiert (Abb. 3.4, B). Zu sehen ist, dass GST-hS4ED eine Größe von ca. 50 kDa hat und von beiden Antikörpern erkannt wird, wohingegen hS4ED bei einer Größe von ca. 26 kDa nur von dem Antikörper gegen Syndecan-4 erkannt wird (Abb. 3.4, B).

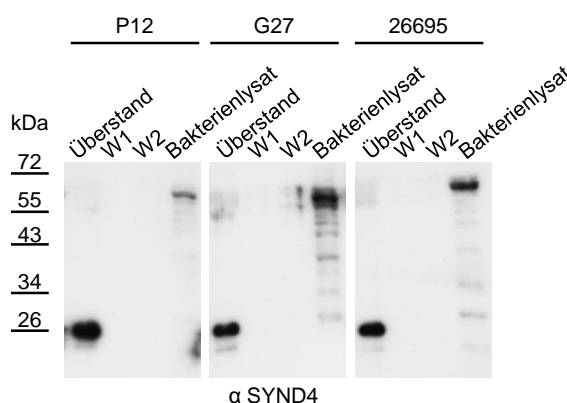


**Abb. 3.4: Heterologe Produktion und Aufreinigung der Ektodomäne von Syndecan-4.**

GST-hS4ED wurde heterolog in *E. coli* DH5 $\alpha$  hergestellt und die Produktion bzw. die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (A) bzw. mittels Western-Blot (B) überprüft (A). Die Induktion der Genexpression erfolgte durch IPTG für 3 h (A,  $t_0$  und  $t_3$ , siehe Pfeilspitze). Nach Aufschluss der Bakterien und Sedimentation der Zelltrümmer (Überstand, Pellet) erfolgte die Aufreinigung über eine GST-Sepharose-Säule. Nicht gebundene Proteine wurden in drei Waschschrritten entfernt (Durchlauf: DL, W1-W3), wobei GST-hS4ED an die Sepharose gebunden ist (Pfeilspitze, Sepharose vor Elution). Die Elution von Syndecan-4 erfolgte mittels Thrombin-Proteolyse (Pfeilspitze Eluat). Der GST-tag bleibt an der Sepharose hängen (Sepharose nach der Elution). (B) GST-hS4ED und aufgereinigte Syndecan-4-Ektodomäne (hS4ED) wurden im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Syndecan-4 ( $\alpha$  SYND4) und gegen GST analysiert.

Anschließend konnte die Bindung der *H. pylori*-Stämme P12, G27 und 26695 an die aufgereinigte hS4ED in einem weiteren *Pull-down*-Experiment (s.o.) überprüft werden.

Der Western-Blot des Experiments zeigt, dass hS4ED nur im Überstand und nicht in den Waschfraktionen oder im Bakterienlysat detektierbar ist (Abb. 3.5). Das hS4ED-Protein präzipitiert nicht mit den Bakterien zusammen, das heißt, dass *H. pylori* unter diesen Bedingungen nicht an die Ektodomäne von Syndecan-4 bindet. Die zuvor in Abb. 3.3 gezeigte Bindung ist auf den GST-tag zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass eine Bindung zwischen *H. pylori* und dem extrazellulären Proteinanteil von Syndecan-4 unwahrscheinlich ist. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *H. pylori* in der Lage ist, an die GAGs zu adhären, was jedoch unabhängig von der Translokationseffizienz von CagA in AGS-Zellen zu sein scheint.



**Abb. 3.5: Pull-down-Experiment von *H. pylori* mit Syndecan-4.**

Die *H. pylori*-Stämme P12, G27 und 26695 wurden mit der Syndecan-4-Ektodomäne inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden Bakterienlysate, sowie Proben aus dem Überstand und den Waschschritten angefertigt. Diese wurden im Western-Blot mit spezifischem Antikörper gegen Syndecan-4 ( $\alpha$  SYND4) analysiert.

### 3.3 Einfluss der HopQ-CEACAM Interaktion auf die CagA-Translokation in HEK-293-Zellen

In vorangegangenen Arbeiten wurden CEA und CEACAM1 als Rezeptoren von HopQ mittels eines *Pull-down*-Experiments identifiziert (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). CEACAMs sind zelluläre Adhäsionsmoleküle, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zusammen eine Immunglobulinsuperfamilie bilden. CEA wird vermehrt von Epithelzellen produziert wohingegen CEACAM1 zusätzlich auch auf der Oberfläche von Leukocyten vorkommt. CEA ist nicht nur ein Zelladhäsionsmolekül, sondern kann auch eine erhöhte Bindung der Zellen an Fibronektin hervorrufen, was indirekt durch den Rezeptor  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermittelt wird (Ordóñez *et al.* 2007). Des Weiteren führt ein durch Antikörper hervorgerufenen Zusammenlagern von CEA zu einer Kolo-kalisierung mit  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Camacho-Leal *et al.* 2007). Das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin wurde als Rezeptor für den T4SS-Apparat identifiziert, der CagA in die Zellen transloziert (Kwok *et al.* 2007, Jimenez-Soto *et al.* 2009). Es ist daher von besonderem Interesse, ob die Bindung von

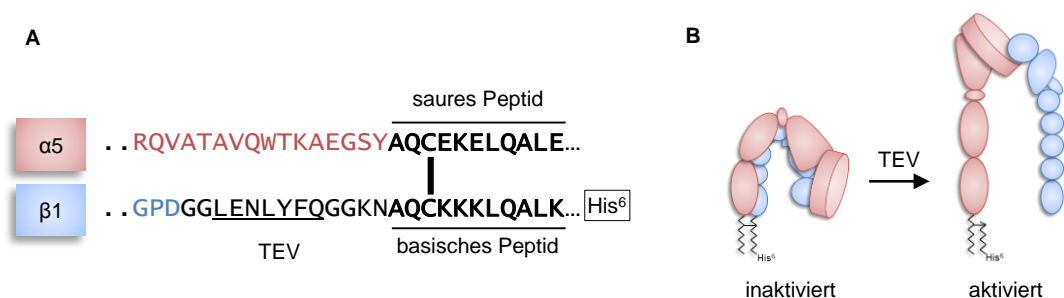


*H. pylori* an CEACAMs einen Einfluss auf  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und dadurch auch auf die CagA-Translokation hat.

V. Königer konnte im Rahmen ihrer Promotion zeigen, dass *H. pylori* in HEK-293-Zellen, die kein CEA oder CEACAM1 produzieren, kein CagA translozieren kann (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Dieser Phänotyp kann durch Transfektion der Zellen mit CEA oder CEACAM1 aufgehoben werden, allerdings lediglich mit *hopQ*-produzierenden *H. pylori*-Stämmen. HEK-293-Zellen eignen sich aus diesen Gründen als Modellsystem, um den Einfluss der HopQ-CEACAM Interaktion auf die CagA-Phosphorylierung genauer zu untersuchen.

### 3.3.1 Potenzielle Interaktion zwischen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und CEACAMs

Ziel dieses Experiments war es, ein potenzielles durch HopQ hervorgerufenen Zusammenspiel zwischen CEACAM und Integrin und eine daraus resultierende Begünstigung der CagA-Translokation zu untersuchen. Zunächst wurde eine potenzielle Interaktion zwischen  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und CEA bzw. CEACAM1 indirekt über ein Bindungsexperiment überprüft. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit löslichem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin inkubiert und die Bindung an diese Zellen gemessen. Dafür wurde  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin als stabiles lösliches Heterodimer produziert und mittels His-tag aufgereinigt (Takagi *et al.* 2001) (s. 2.4.3 und 2.9.3). Unter nativen Bedingungen sind die Untereinheiten des  $\alpha 5\beta 1$ -Dimers nicht kovalent miteinander verbunden. Die Aufreinigung eines stabilen Dimers ist durch eine molekulare Klammer gewährleistet. Dafür ist an die  $\alpha 5$ -Untereinheit ein saures und an die  $\beta 1$ -Untereinheit ein basisches Peptid fusioniert. Die Wechselwirkung zwischen den Peptiden wird durch eine eingefügte Disulfidbrücke zusätzlich verstärkt (Abb. 3.6, A). Die molekulare Klammer führt dazu, dass das Dimer in der angewinkelten, inaktivierten Konformation vorliegt. Eine Aktivierung kann durch die proteolytische Abspaltung der Klammer von der  $\beta 1$ -Untereinheit erfolgen, wodurch auch der His-tag von der  $\beta$ -Untereinheit entfernt wird (Abb. 3.6, B).



**Abb. 3.6: Schematische Darstellung des löslichen Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Dimers.**

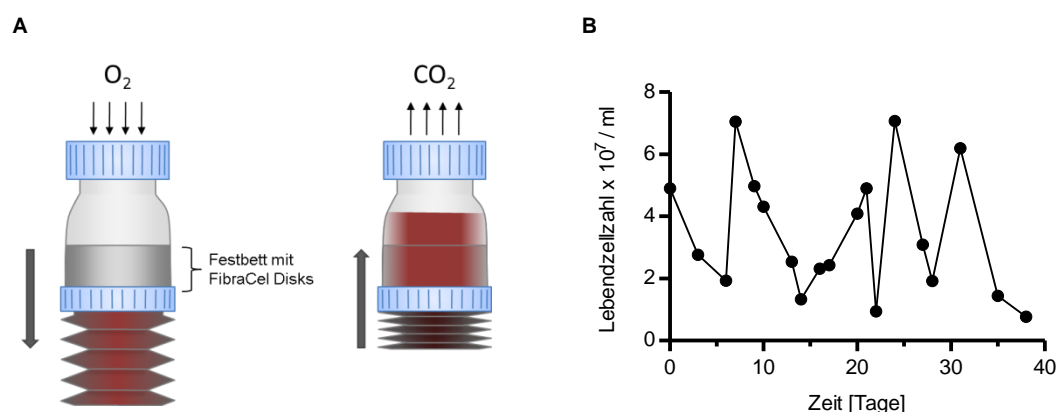
(A) Die extrazellulären Bereiche der  $\alpha 5$ - (AS 1-954) und  $\beta 1$ - (AS 1-708) Integrinuntereinheiten sind durch ein saures bzw. basisches Peptid (fett; 30 AS) und eine Disulfidbrücke (C-C) miteinander fusioniert (molekulare Klammer). Zusätzlich befindet sich in der  $\beta 1$ -Untereinheit eine TEV-Protease-Erkennungssequenz (unterstrichen) und der His-tag (His<sup>6</sup>). (B) Die Aktivierung des Dimers erfolgt durch Proteolyse mit dem Enzym TEV. Die molekulare Klammer wird dabei von der  $\beta 1$ -Untereinheit abgespalten, wodurch das Dimer von der angewinkelten, inaktivierten Konformation in die ausgestreckte, aktive wechselt.

### 3.3.1.1 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten $\alpha 5 \beta 1$ -Integrindimer mit dem Fibrastage-System

Für die Untersuchung einer potenziellen Interaktion zwischen CEA bzw. CEACAM1 und  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin musste zunächst das stabile Integrindimer hergestellt und aufgereinigt werden. Die Produktion des Dimers wurde in CHO lec 3.2.8.1-Zellen durchgeführt, da diese Zellen über vier Mutationen in den N- und O-Glykosylierungsbiosynthesewegen verfügen, wodurch das Integrindimer nicht massiv glykosyliert ist.

Die Zellen wurden 40 Tage in einem Fibrastage-System (New Brunswick) kultiviert. Die Fibrastage-Zellkulturflaschen besitzen ein Festbett mit *FibraCel Disks*, an dem die Zellen adhären können, sowie einen beweglichen Teil (Abb. 3.7, A). Im Deckel der Flasche befindet sich ein Filter zum Luftaustausch. Dieser wird gewährleistet, indem der bewegliche Teil der Flasche komprimiert wird, so dass Medium über die *FibraCel Disks* gespült wird und verbrauchte Luft durch den Filter aus der Flasche entweicht. Wird in entgegengesetzter Richtung der bewegliche Teil auseinander gezogen, fließt erneut Medium um die Zellen und frische Luft wird durch den Filter hineingesaugt. Die Proteinproduktion der Zellen ist aufgrund der Bewegung des Mediums und des andauernden Luftaustausches höher als in herkömmlichen Zellkulturflaschen.

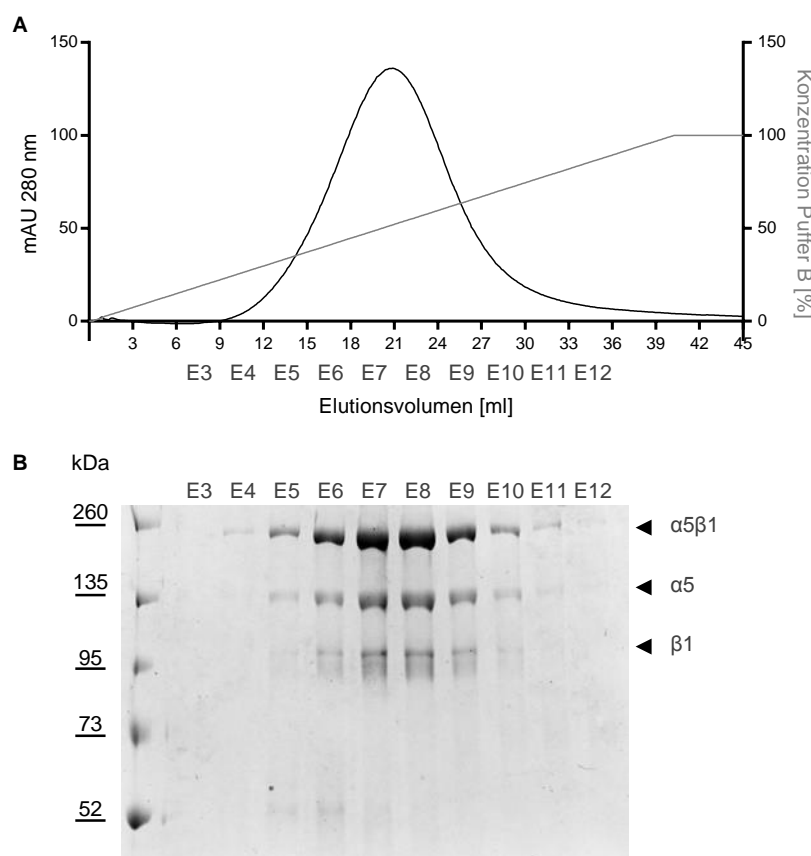
Eine regelmäßige Neubesiedelung der *FibraCel Disks* ist nicht nötig, da durch die Bewegung tote Zellen von der Matrix abgelöst und durch lebende Zellen ersetzt werden. Das Wachstum findet dadurch in zwei sich wiederholenden Phasen statt: 1. Absterben von Zellen gefolgt von Wachstum (2.). Die Bestimmung der Lebendzellzahl alle zwei bis drei Tage zeigt den Zyklus der unterschiedlichen Phasen an (s. Abb. 3.7, B). Der Zellkulturüberstand enthält sekretierte lösliche  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrindimere und wurde wöchentlich gesammelt.



**Abb. 3.7: Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen im Fibrastage-System (New Brunswick).**

Die Produktion von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin wurde in Fibrastage-Zellkulturflaschen (A) durchgeführt. Das Medium wird über die Zellen auf den *FibraCel Disks* durch Kompression und Expansion gespült. Das Wachstum von CHO lec 3.2.8.1-Zellen findet in zwei Phasen statt: 1. Absterben von Zellen gefolgt von einer Neubesiedelung und Wachstum der Zellen (2.). (B) Bestimmung der Lebendzellzahl während der Kultivierung in Fibrastage-Zellkulturflaschen.

Die Aufreinigung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Äkta Explorer, GE Healthcare) über den His-*tag* des Proteins. Das Elutionsprofil zeigt, dass das Dimer bei ca. 25 bis 50 % Puffer B (s. 2.9.3), was eine Gesamtkonzentration von ca. 77 mM bis 135 mM Imidazol entspricht, von der His-Trap Säule eluiert (Abb. 3.8, A). Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und Coomassie-Färbung zeigt (s. 2.7.2), dass neben dem  $\alpha 5\beta 1$ -Dimer auf der Höhe von ca. 260 kDa auch die Untereinheiten einzeln ( $\alpha 5$  bei ca. 135 kDa;  $\beta 1$  bei ca. 95 kDa) vorliegen. Eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen würde zu einer Aufspaltung der molekularen Klammer und somit zur Dissoziation des Dimers führen. Eine Verunreinigung mit anderen Proteinen ist nicht zu erkennen. Die Elutionsfraktionen E6 bis E9 wurden aufgrund ihres hohen Gehalts an  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vereinigt.



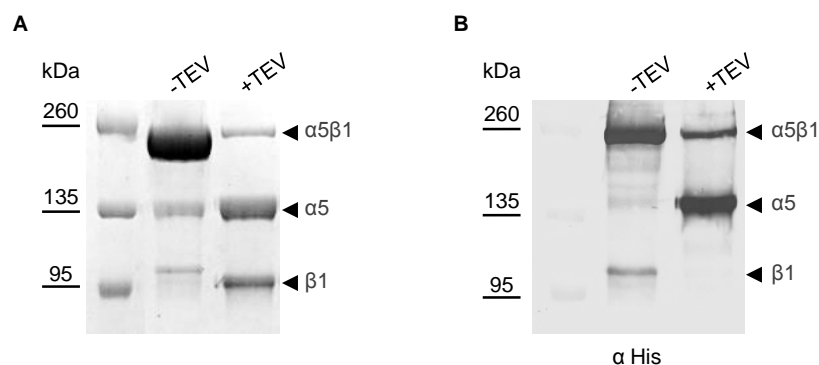
**Abb. 3.8: HPLC-Elutionsprofil und SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen der Aufreinigung des löslichen  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimers.**

(A) Die Elution des Dimers bei steigender Konzentration des Elutionspuffers B wurde bei 280 nm gemessen. Es wurden Elutionsfraktionen (E3-E12) mit einem Volumen von je 3 ml aufgefangen. (B) Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung auf den Reinheitsgrad und die Mengen des  $\alpha 5\beta 1$ -Dimers untersucht.

Die Untersuchung einer potenziellen Interaktion mit CEA bzw. CEACAM1 sollte in beiden Konformationen des Integrins, inaktiviert und aktiviert, untersucht werden. Das aufgereinigte Dimer liegt aufgrund der molekularen Klammer in der inaktiven Form vor.

Eine Aktivierung wurde durch die TEV-Protease erreicht (s. Abb. 3.6, B). Die Coomassie-Färbung vor der Proteolyse zeigt ein stabiles Dimer unter denaturierenden, aber nicht unter reduzierenden Bedingungen. Dagegen zerfällt das Dimer nach der Proteolyse bei denselben Bedingungen in die  $\alpha 5$ - und  $\beta 1$ -Untereinheiten (Abb. 3.9, A). Die molekulare Klammer ist nun nur noch an der  $\alpha 5$ -Untereinheit gebunden und fehlt an der  $\beta 1$ -Untereinheit, wodurch das Protein etwas kleiner ist als vor der Proteolyse. Des Weiteren befindet sich dadurch der His-tag nun an der  $\alpha 5$ -Untereinheit (s. Abb. 3.6). Dieser Zustand ist im Western-Blot bei nicht reduzierenden Bedingungen mit einem Antikörper gegen Polyhistidin zu erkennen. Der Antikörper erkennt vor der Proteolyse die  $\beta 1$ - und danach die  $\alpha 5$ -Untereinheit, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Proteolyse und somit die Aktivierung des Integrindimers vollständig ist (Abb. 3.9, B). Daher liegt der Schluss nahe, dass die Bande auf Höhe des  $\alpha 5\beta 1$ -Dimers im Coomassie gefärbten SDS-Gel sowie dem Western-Blot nach der Proteolyse (s. Abb. 3.9 A und B +TEV) auf eine unvollständige Denaturierung und nicht auf eine unvollendete Proteolyse zurückzuführen ist.

Das  $\alpha 5\beta 1$ -Dimer konnte erfolgreich hergestellt und von dem inaktiven Zustand in den aktiven überführt werden. Die  $\alpha 5\beta 1$ -Dimere wurden für Interaktionsexperimente mit CEA bzw. CEACAM1 eingesetzt, was im nächsten Abschnitt beschrieben wird.



**Abb. 3.9: SDS-PAGE und Western-Blot der Proteolyse des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimers.**

(A) SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen mit Coomassie-Färbung des  $\alpha 5\beta 1$ -Dimers vor (-TEV) und nach (+TEV) der Proteolyse mit TEV. (B) Das  $\alpha 5\beta 1$ -Dimer wurde im Western-Blot (unter nicht reduzierenden Bedingungen) mit einem spezifischen Antikörper gegen den His-tag vor und nach der proteolytischen Spaltung mit TEV detektiert. Die Pfeilspitzen zeigen in beiden Abbildungen das Dimer und die jeweiligen Untereinheiten an.

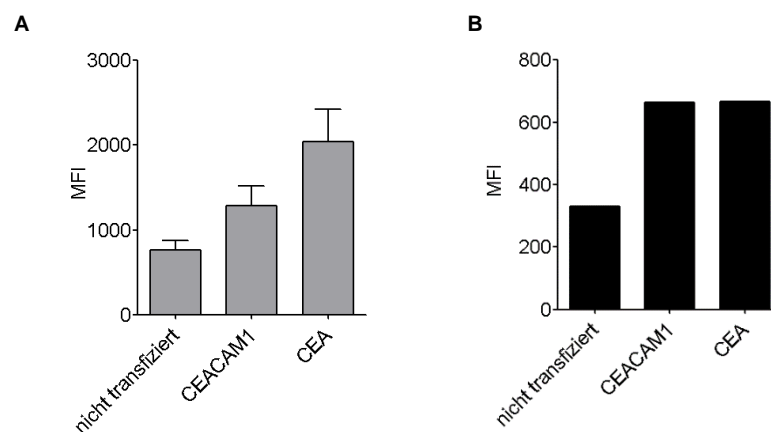
### 3.3.1.2 Bindungsexperiment von löslichem aktivierten und inaktivierten $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer an HEK-293-Zellen

Die Untersuchung einer potenziellen Bindung von löslichem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer an CEACAM wurde indirekt mit HEK-293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die inaktivierten und aktivierten Dimere zunächst mit dem Farbstoff Alexa647 markiert und anschließend mit CEACAM1- bzw. CEA-produzierenden HEK-293-Zellen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde daraufhin die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)

der Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Die MFI repräsentiert die Integrindimere, die an Zellen gebunden sind. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen verwendet, die keine CEACAMs besitzen.

Die Bindung von inaktiviertem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an HEK-293-Zellen steigt gegenüber der nicht transfizierten Kontrolle an, wenn CEACAM1 und CEA auf der Zelloberfläche präsentiert sind (Abb. 3.10, A). Die Bindung an Zellen die CEA produzieren ist am stärksten (Abb. 3.10, A). Aktiviertes  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer zeigt in einem Experiment eine gleichstarke Bindung an Zellen die CEACAM1 bzw. CEA auf der Oberfläche besitzen (Abb. 3.10, B), die ebenfalls höher ist, als die Bindung an nicht transfizierte Kontrollzellen.

Diese vorläufigen Daten deuten auf eine durch CEA bzw. CEACAM1 verstärkte Bindung von inaktiviertem und aktiviertem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an HEK-293-Zellen hin. Ob diese höhere Affinität direkt durch die CEACAM-Moleküle oder indirekt durch CEACAM-vermittelte Signalübertragung zustande kommt, bleibt durch dieses Experiment jedoch ungeklärt.



**Abb. 3.10: Bindung von löslichem inaktivierten bzw. aktivierten  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer an HEK-293-Zellen.**

Alexa647-markiertes  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer wurde mit CEACAM1- bzw. CEA-produzierenden HEK-293-Zellen inkubiert. Nach ausführlichem Waschen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen, die der Menge an gebundenen Dimeren entspricht, im Durchflusscytometer bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen verwendet. (A) Bindung des inaktivierten  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimers an HEK-293-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Bindung des aktivierten  $\alpha 5\beta 1$ -Integrindimer an HEK-293-Zellen (ein Experiment).

### 3.3.2 Bestimmung der für die CagA-Translokation essenziellen CEA-Domänen

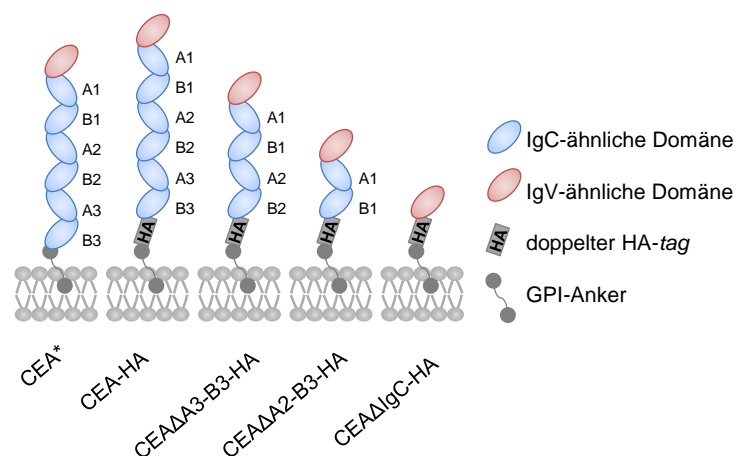
Die erhöhte Bindung von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an HEK-293-Zellen die CEA bzw. CEACAM1 produzieren, die in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wurde, deutet auf eine Interaktion zwischen Integrin und CEACAM hin. Außerdem konnte Verena Königer zeigen, dass eine CagA-Translokation in HEK-293-Zellen nur bei einer Expression von *CEACAM1* bzw. *CEA* möglich ist (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Für die HopQ-abhängige Adhäsion an lösliche CEACAM1-bzw. CEA-Konstrukte sind nur die IgV-

Domänen (variabler N-terminaler Teil von CEACAMs) notwendig. Sowohl CEACAM1 als auch CEA haben neben der IgV-Domäne aber auch IgC-ähnliche Domänen.

Des Weiteren ist bekannt, dass CEA sich aufgrund des GPI-Ankers in cholesterinreichen Bereichen der Cytoplasmamembran (auch *Lipid-raft* genannt) befindet und CEACAM1 in der Lage ist unter bestimmten Bedingungen mit diesen Bereichen zu interagieren. Integrin ist ebenfalls in *Lipid-rafts* lokalisiert. Dies führte zu der Hypothese, dass CEACAMs mit ihren IgC-ähnlichen Domänen eventuell direkt an  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin binden, wodurch die CagA-Translokation in Zellen ermöglicht wird. Deshalb sollte die Fragestellung geklärt werden, ob CEACAMs mit ihren IgC-ähnlichen Domänen an der CagA-Translokation in CEACAM-produzierenden HEK-293-Zellen beteiligt sind.

### 3.3.2.1 Schrittweise Verkürzungen von CEA und deren Auswirkung auf die CagA-Translokation

Zur Überprüfung der Fragestellung nach der Relevanz der IgC-Domänen für die Translokation von CagA wurde CEA schrittweise um jeweils zwei IgC-Domänen verkürzt, in HEK-293-Zellen transfiziert und anschließend die CagA-Translokation in diesen Zellen getestet. Damit die Produktion der Proteine im Western-Blot und mittels Durchflusszytometrie kontrolliert werden kann, wurde ein doppelter Hämagglutinin-tag (HA-tag) vor den GPI-Anker des CEA-Proteins kloniert. Nach dem Verkürzen und dem Einfügen des HA-tags wurden die Konstrukte auf ihre Richtigkeit mittels Sequenzierung überprüft. Eine schematische Darstellung der CEA-Verkürzungen ist in Abb. 3.11 zu sehen.

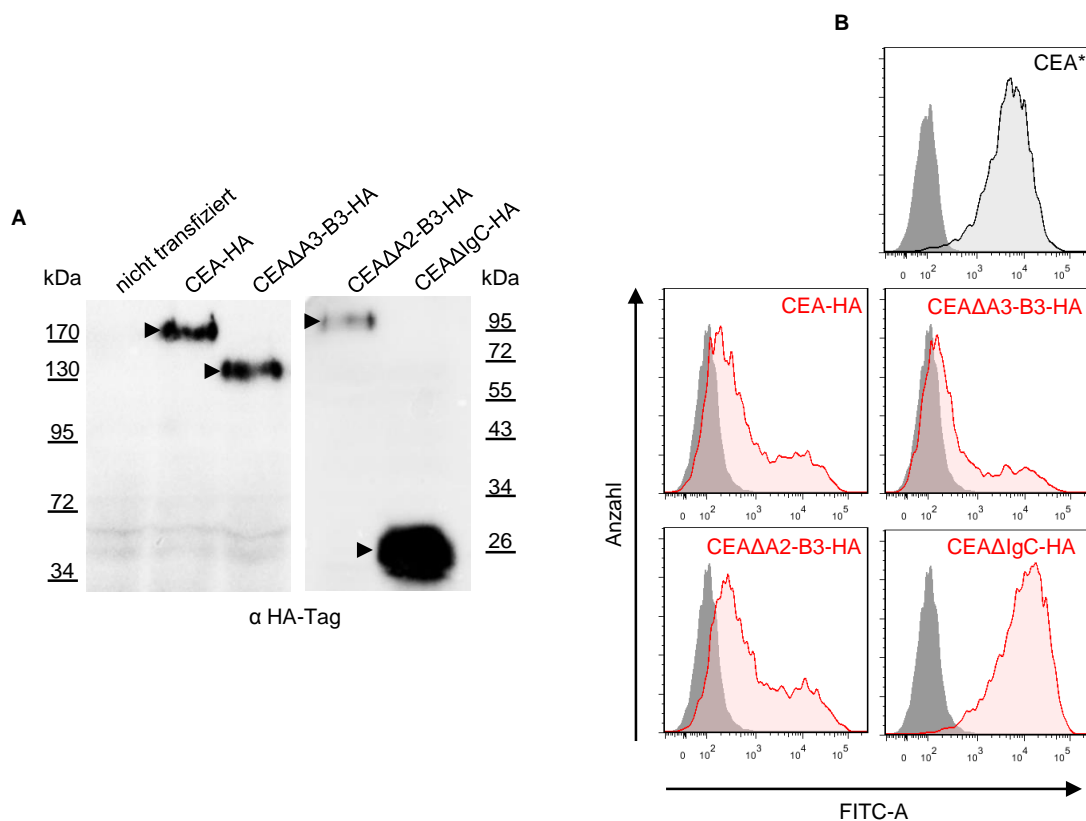


**Abb. 3.11: Schematische Darstellung der verschiedenen CEA Verkürzungen**

Schematische Darstellung der schrittweise Verkürzung um die IgC-ähnlichen Domänen des CEA und deren Bezeichnungen (CEA\*, CEA-produzierende HEK-293-Zelllinie von V. Nägele (Nägele 2010)). Es wurde ein doppelter HA-tag für die immunologische Nachweisbarkeit des Proteins vor den GPI-Anker eingefügt.

Nach der Transfektion der Expressionsplasmide in HEK-293-Zellen wurde die Produktion der CEA-Verkürzungen verifiziert. Der Western-Blot mit spezifischem Antikörper gegen den HA-tag zeigt, dass die drei Verkürzungen, sowie das vollständige

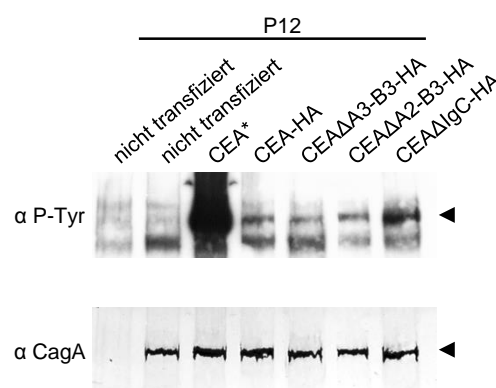
CEA mit inseriertem HA-tag, produziert werden (Abb. 3.12, A). Die Proteine sind aufgrund von Glykosylierungen nicht auf der eigentlichen Höhe der Proteinmasse, sondern deutlich darüber. Des Weiteren ist zu sehen, dass am meisten CEA $\Delta$ IgC-HA gebildet wird und am wenigsten CEA $\Delta$ A2-B3-HA (Abb. 3.12, A). Im Western-Blot wird der Gesamtproteingehalt des CEA detektiert, jedoch gibt er keinen Aufschluss über die korrekte Oberflächenlokalisation der Moleküle. Das auf der Oberfläche vorhandene CEA wurde mit spezifischen Antikörpern markiert und im Durchflusscytometer analysiert. Auf allen transfizierten Zellen ist CEA auf der Oberfläche vorhanden (Abb. 3.12, B). Die Zelllinien CEA und CEA $\Delta$ IgC-HA sind homogen, d.h. alle Zellen produzieren in ähnlichem Maße CEA auf der Zelloberfläche. Die anderen Zelllinien sind heterogener. Nur ein Teil der Zellen produziert CEA auf der Oberfläche, wohingegen der größte Anteil gar kein CEA aufweist.



**Abb. 3.12: Überprüfung der Produktion der verkürzten CEA-Proteine in HEK-293-Zellen.**

(A) Western-Blot gleicher Mengen von Zelllysaten der transfizierten HEK-293-Zellen. Die Markierung mit spezifischem Antikörper gegen den HA-tag zeigt die heterologe Synthese der CEA-Moleküle (schwarze Pfeilspitzen). (B) Graphische Darstellung des Nachweises der Produktion von CEA auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA (CEA mit  $\alpha$  CEA, alle anderen  $\alpha$  HA) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenzintensität eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit den entsprechenden Antikörpern markiert (grau ausgefüllte Histogramme).

Die Zelllinien wurden dennoch mit *H. pylori* P12 infiziert und die CagA-Phosphorylierung wurde überprüft. In allen transfizierten Zelllinien ist eine CagA-Phosphorylierung zu detektieren, wogegen in nicht transfizierten HEK-293-Zellen keine zu sehen ist (Abb. 3.13). Die Effizienz der CagA-Translokation ist in der Zelllinie CEA am stärksten, obwohl CEA-HA auch das vollständige CEA produziert. Zum einen ist denkbar, dass es aufgrund der Heterogenität der Zelllinie (Abb. 3.12, B) zu dieser verringerten CagA-Phosphorylierung kommt, zum anderen aber auch, dass der HA-tag einen Einfluss auf das CEA-Protein hat. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die CagA-Translokation trotz der Entfernung der IgC-Domänen möglich ist, unabhängig von der Anzahl der entfernten Domänen.



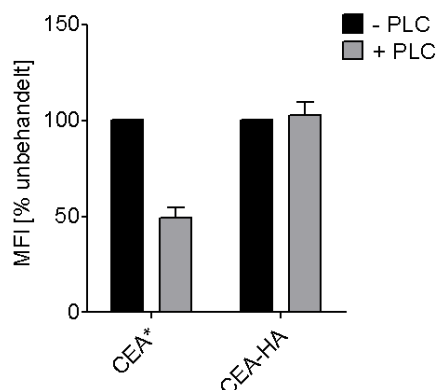
**Abb. 3.13: Auswirkungen der CEA Verkürzungen auf die CagA-Translokation.**

Die HEK-293-Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 mit einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit Antikörpern gegen CagA und tyrosinphosphorylierte Proteine (auch phosphoryliertes CagA, α P-Tyr) im Western-Blot analysiert. Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen die jeweiligen Proteinbanden an.

### 3.3.2.2 Phospholipase C-Sensitivität der CEA-Verkürzungen

Der HA-tag wurde in den zuvor beschriebenen Experimenten direkt vor die Signalsequenz des GPI-Ankers kloniert. Um auszuschließen, dass dieser Einbau zu einer falschen Insertion der Proteine in die Cytoplasmamembran führt, wurde überprüft, ob CEA-HA mittels GPI in der Membran verankert ist. Dazu wurde ein Phospholipase C-Hydrolyseexperiment durchgeführt. Die Phospholipase C (PLC) ist ein Enzym, das Phospholipide zwischen Glycerin und der Phosphatgruppe spaltet. Das bedeutet, dass GPI-verankerte Proteine durch dieses Enzym von der Cytoplasmamembran abgelöst werden. In dem hier durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass CEA aber nicht CEA-HA sensitiv gegenüber der PLC ist (Abb. 3.14). Die Behandlung der CEA-produzierenden Zelllinie mit PLC weist eine Reduktion von 50 % des sich auf der Oberfläche befindenden CEA auf. Die gleiche Behandlung hatte jedoch keinen Effekt auf das CEA-HA. Einerseits ist es denkbar, dass aufgrund der geringen Transfektionsrate dieser Zelllinie (Abb. 3.12, B) die Abspaltung des CEA-HAs unter diesen Bedingungen nicht detektierbar ist. Andererseits kann die Resistenz von CEA-HA gegenüber der PLC auch bedeuten, dass es nicht mittels GPI in der Membran verankert ist.

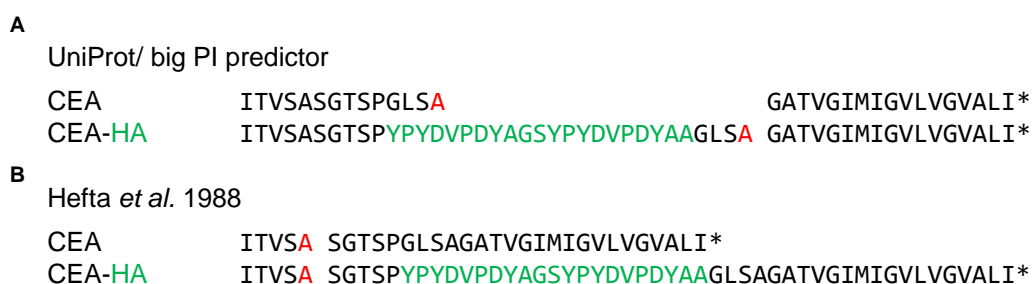




**Abb. 3.14: Phospholipase C (PLC) Sensitivität von CEA und CEA-HA in HEK-293-Zellen.**

CEA- und CEA-HA-produzierende HEK-293-Zellen wurden mit PLC behandelt (+PLC). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-PLC). Die Zellen wurden anschließend mit spezifischem Antikörper gegen CEA ( $\alpha$  CEA) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Die daraufhin im Durchflusscytometer gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) korreliert somit mit dem auf der Oberfläche lokalisierten CEA. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI zweier unabhängiger Experimente.

Die Signalsequenz des GPI-Ankers von CEA war aufgrund der Informationen der web-basierten Dienste UniProt und big PI Predictor bestimmt worden und anhand dieser wurde die Position des HA-tags festgelegt (Abb. 3.15, A). Die Informationen stellten sich aber als fehlerhaft heraus, denn 1988 analysierte die Arbeitsgruppe um Shively die Spaltstelle biochemisch und kam zu dem Schluss, dass der GPI-Anker an das Alanin an der Aminosäureposition 676 und nicht an das der Position 685 angeheftet wird (Hefta *et al.* 1988). Der Einbau des HA-tags an dieser Stelle führt vermutlich zu einer Zerstörung der GPI-Signalsequenz im CEA-HA. Daraus lässt sich schließen, dass wahrscheinlich neben CEA-HA auch die verkürzten CEA-Proteine nicht korrekt in der Cytoplasmamembran inseriert sind. Folglich wurden die IgC-Domänen erneut unter Berücksichtigung der korrekten Spaltstelle entfernt, was im folgenden Abschnitt betrachtet wird.

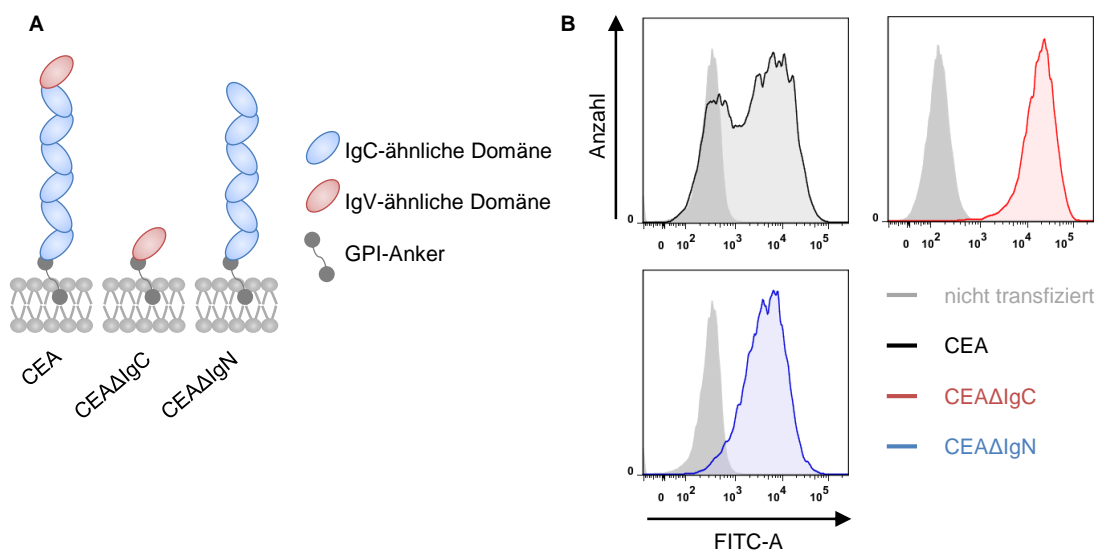


**Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Spaltstelle für die Anheftung des GPI an den C-terminalen Bereich von CEA und CEA-HA.**

(A) Die C-terminalen Aminosäuren 672 bis 702 von CEA und die Aminosäuren 672 bis 723 von CEA-HA (HA-tag grün) mit der von UniProt und big PI predictor angegebenen Spaltstelle (Alanin, rot, AS 685 im CEA). (B) Die Aminosäuren 672 bis 702 von CEA und die Aminosäuren 672 bis 723 von CEA-HA (HA-tag grün) mit der von Hefta *et al.* 1998 ermittelten Spaltstelle (Alanin, rot, AS 676 im CEA) (Hefta *et al.* 1988). Die carboxyterminalen Bereiche der Proteine sind gekennzeichnet (\*).

### 3.3.2.3 Eliminierung der IgV- bzw. der IgC-Domänen im CEA und deren Folgen für die Translokation von CagA

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der *HA-tag* und die fehlerhafte Insertion in die Cytoplasmamembran einen Einfluss auf die CagA-Translokation hat, wurde die Verkürzung von CEA erneut ohne *HA-tag* kloniert. Dabei wurde die korrekte Spaltstelle für die GPI-Verankerung sowie der Aufbau der Exone berücksichtigt, da letztere im Fall von CEACAMs in Einklang mit der Domänenstruktur der Proteine sind. Es wurde auf die schrittweise Verkürzung verzichtet und alle IgC-Domänen gleichzeitig entfernt ( $\Delta$ IgC). Zusätzlich wurde als negative Kontrolle CEA ohne IgV-Domäne kloniert, da *H. pylori* an diese HopQ-abhängig bindet. Die entsprechenden verkürzten CEA Moleküle sind in Abb. 3.16 A schematisch dargestellt. Die klonierten Expressionsplasmide wurden auf ihre Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft und anschließend in HEK-293-Zellen transfiziert. Daraufhin folgte eine Sortierung der CEA-produzierenden HEK-293-Zellen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Die Lokalisation auf der Oberfläche der Zellen wurde anschließend regelmäßig durchflusscytometrisch überprüft. Die Population der CEA $\Delta$ IgC- und der CEA $\Delta$ IgV-Zelllinien sind homogen, das heißt alle Zellen produzieren CEA auf der Oberfläche in ungefähr der gleichen Menge (Abb. 3.16, B).

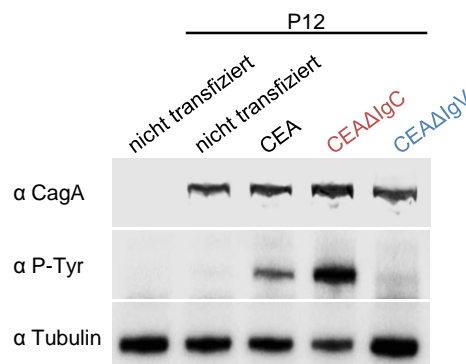


**Abb. 3.16: Schematische Darstellung von CEA $\Delta$ IgC bzw. CEA $\Delta$ IgV und deren Produktion in HEK-293-Zellen.**

(A) Schematische Darstellung der CEA $\Delta$ IgC- und CEA $\Delta$ IgV-Verkürzungen im Vergleich zum vollständigen CEA. (B) Graphische Darstellung von CEA auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen nach dem Sortieren der Zellen im FACS. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA (CEA u. CEA $\Delta$ IgV mit  $\alpha$ CEA, CEA $\Delta$ IgC mit  $\alpha$ Pan-CEACAM) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit den entsprechenden Antikörpern markiert (grau ausgefüllte Histogramme).

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte CEA-produzierenden HEK-293-Zelllinie war auch nach zweimaligem Sortieren noch heterogen. Circa 50 % der Zellen produzieren CEA, die restlichen nicht (Abb. 3.16, B). Trotz Selektionsmarker und Sortieren ist diese Zelllinie nicht stabil geblieben, möglicherweise weil Zellen ohne CEA schneller wachsen. Die Zelllinie wurde deswegen regelmäßig auf die CEA Produktion überprüft und gegebenenfalls neu aus der Kryokonservierung aufgetaut.

Die Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 infiziert und die CagA-Translokation bestimmt, um den Einfluss der IgC-Domänen auf die Translokation des Cytotoxins zu untersuchen. HEK-293-Zellen, die CEA $\Delta$ IgC produzieren zeigen eine CagA-Translokation, die CEA $\Delta$ IgV-Zellen aber nicht (Abb. 3.17). Des Weiteren weist die CEA-Zelllinie eine schwächere CagA-Phosphorylierung auf als die Zellen mit CEA $\Delta$ IgC. Die geringere Translokation von CagA ist darauf zurückzuführen, dass nur ca. 50 % der Zellen CEA auf der Zelloberfläche besitzt. Eine erfolgreiche Translokation von CagA in HEK-293-Zellen ist somit von der IgV-Domäne nicht aber von den IgC-ähnlichen Domänen abhängig. Folglich ist es auch sehr unwahrscheinlich, dass die IgC-Domänen von CEA direkt mit  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin interagieren, da sie für die CagA-Translokation nicht notwendig sind.



**Abb. 3.17: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit CEA $\Delta$ IgC- bzw. CEA $\Delta$ IgV-produzierenden HEK-293-Zellen**

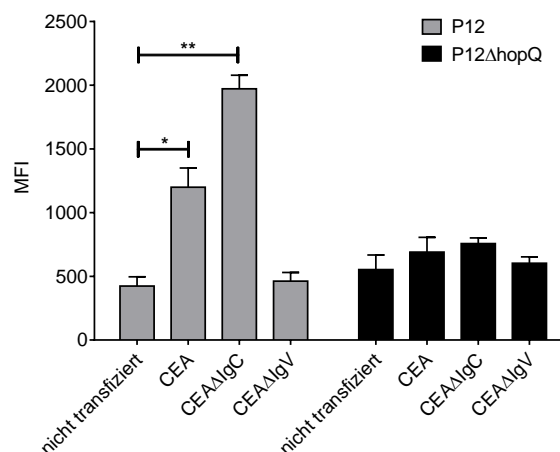
Die HEK-293 Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 bei einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit Antikörpern gegen CagA und phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

### 3.3.3 Ermittlung der Adhärenz von *H. pylori* an membranständiges CEA in Abhängigkeit der IgV- bzw. der IgC-Domänen

Ein stark verkürztes CEA ( $\Delta$ IgC) reicht aus, um *H. pylori* in die Lage zu versetzen, CagA in HEK-293-Zellen zu translozieren (s. 3.3.2.3). Die einzig übriggebliebene Domäne ist die IgV-ähnliche, an die *H. pylori* HopQ-abhängig bindet (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Diese Bindung wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem zellulären Kontext untersucht. Dazu wurden die Zellen mit GFP-produzierenden *H. pylori* P12 und P12 $\Delta$ hopQ infiziert und anschließend nach mehrmaligem Waschen die Fluoreszenz der Zellen im Durchflusscytometer bestimmt. Diese entspricht den

adhärenten grünfluoreszierenden Bakterien. Nicht adhärierte aber ebenfalls fluoreszierende Bakterien werden aufgrund ihrer Größe und den Einstellungen des Durchflusscytometers nicht gemessen.

Es ist eine signifikant höhere Affinität von *H. pylori* P12 an CEA- und CEAΔIgC-produzierende Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten HEK-293-Zellen zu sehen (Abb. 3.18). Dagegen zeigt *H. pylori* P12 die gleiche Adhäsion an Zellen die CEAΔIgV besitzen wie an nicht transfizierte Zellen. Die Affinität der Bindung von *H. pylori* P12ΔhopQ hingegen ist an alle Zelllinien gleich (Abb. 3.18). Das heißt, dass *H. pylori* HopQ-abhängig an die IgV-Domäne von CEA auf der Zelloberfläche binden kann. Daraus resultiert ein Zusammenhang zwischen der Adhäsion von *H. pylori* an HEK-293-Zellen und der CagA-Translokation, denn nur in den Zelllinien, an die *H. pylori* mit einer signifikant höheren Affinität adhäriert, findet auch eine CagA-Phosphorylierung statt. Das wird von der Tatsache unterstützt, dass *H. pylori* P12ΔhopQ nicht in der Lage ist in eine der drei Zelllinien CagA zu translozieren (Daten hier nicht gezeigt) und auch an alle Zelllinien die gleiche geringe Bindungsaffinität zeigt.



**Abb. 3.18: Die Adhärenz von *H. pylori* an CEAΔIgC- und CEAΔIgV-produzierende HEK-293-Zellen.**

Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ an CEA, CEAΔIgC bzw. CEAΔIgV auf HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit einer MOI von 60 infiziert, gewaschen und anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärenen *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

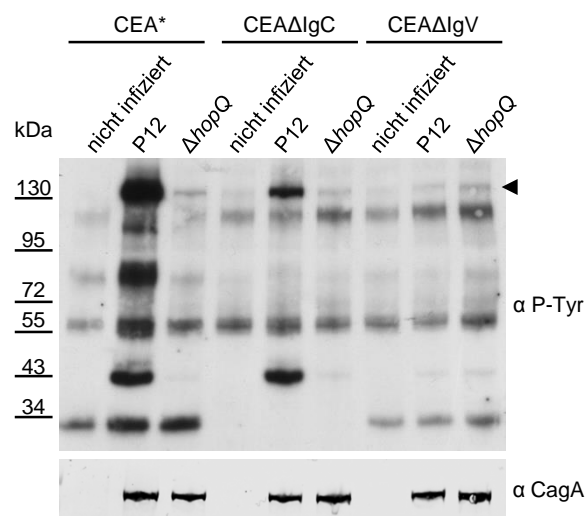
Die hier gezeigte CEACAM-abhängige Adhäsion an HEK-293-Zellen ist ebenfalls von HopQ-abhängig und zusätzlich unabhängig von den IgC-Domänen des CEA-Moleküls. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der *Pull-down*-Experimente von Verena Königer, die zeigen, dass *H. pylori* HopQ-abhängig an die IgV-Domäne von CEACAM1 und CEA bindet (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Adhäsion an die IgV-Domäne von CEA konnte durch die hier durchgeführten Experimente im zellulären Kontext bestätigt werden. Zusätzlich konnte so der Zusammenhang zwischen

der CEA-abhängigen Adhäsion an HEK-293-Zellen und der CagA-Translokation eindeutig herausgestellt werden.

### 3.3.4 Antikörpervermittelte Vernetzung von adhäsionsunfähigem CEAΔIgV

Wie die vorherigen Experimente zeigten, ist die Bindung von *H. pylori* an HEK-293-Zellen verstärkt, sobald die IgV-ähnliche Domäne auf der Oberfläche der Zellen vorhanden ist, aber nicht wenn diese fehlt. Das Entfernen der IgV-Domäne hat ebenfalls Auswirkungen auf die Eigenschaften von CEA. Die IgV-Domäne ist für die homophile Bindung notwendig als auch für die interzelluläre Adhäsion und die Inhibition der Zelldifferenzierung (Eidelman *et al.* 1993, Zhou *et al.* 1993). Durch das Entfernen der IgV-Domänen verliert CEA die Fähigkeit die Zelldifferenzierung zu inhibieren. Dieser Effekt kann durch eine antikörpervermittelte Vernetzung aufgehoben werden (Taheri *et al.* 2003). Des Weiteren kann durch Vernetzung ein Zusammenlagern von CEAΔIgV hervorgerufen werden, was zu einer Aktivierung von und Kolo-kalisierung mit α5β1-Integrin führt (Camacho-Leal *et al.* 2007).

*H. pylori* ist nicht in der Lage, CagA in CEAΔIgV-produzierende HEK-293-Zellen zu translozieren. Die Translokationsinkompetenz kann einerseits an der fehlenden Bindungsstelle im CEA und somit der Adhärenz von *H. pylori* an die Zellen liegen. Andererseits wäre denkbar, dass eine für die CagA-Translokation notwendige Signaltransduktion durch den Verlust der homophilen Bindung von CEA nicht ausgelöst werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Infektionsexperiment bei gleichzeitiger Vernetzung von CEA durch Antikörper durchgeführt und die CagA-Tyrosinphosphorylierung gemessen. Der Antikörper für die Quervernetzung wurde unmittelbar vor der Infektion mit *H. pylori* P12 und P12ΔhopQ zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zelllinien CEA, CEAΔIgV und CEAΔIgC wurden benutzt, wobei letztere als Negativkontrolle diente, da der Antikörper die IgC-Domänen erkennt und somit nicht an CEAΔIgC binden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die CagA-Phosphorylierung bei P12 und den Zelllinien CEA und CEAΔIgC zu erkennen ist, aber nicht wenn HopQ fehlt (Abb. 3.19). Die Quervernetzung der CEAΔIgV-Moleküle führte weder bei der Infektion mit P12-Wildtyp noch mit P12ΔhopQ zu einer CagA-Translokation in HEK-293-Zellen die nennenswert über das Hintergrundsignal hinausgehen würde. Ebenso zeigt die P12ΔhopQ-Mutante keine CagA-Translokation in Zellen mit CEA, obwohl hier auch eine Vernetzung der CEA-Moleküle durch den Antikörper hervorgerufen wird. Die Translokationsinkompetenz der CEAΔIgV-Zelllinie liegt somit wahrscheinlich an der fehlenden Bindungsstelle von *H. pylori* und nicht an einem durch die Zusammenlagerung hervorgerufen Signaltransduktionsmechanismus.



**Abb. 3.19: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment mit immunglobulärer Vernetzung von CEA.**

Die HEK-293-Zellen wurden direkt vor der 4-stündigen Infektion mit *H. pylori* P12 und P12 $\Delta$ hopQ bei einer MOI von 60 mit 1,2  $\mu$ g/10<sup>6</sup> Zellen  $\alpha$  CEA Antikörper behandelt. Gleiche Mengen an Zelllysaten wurden im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Tyrosin-phosphorylierte Proteine ( $\alpha$  P-Tyr) und gegen CagA analysiert. Phosphoryliertes CagA ist mit einer schwarzen Pfeilspitze gekennzeichnet.

Auffällig ist, dass in den Proben von CEA und CEA $\Delta$ IgV ein zusätzliches phosphoryliertes Protein bei einer Größe von ca. 34 kDa zu sehen ist (s. Abb. 3.19). Diese Bande ist sowohl in den infizierten als auch in den nicht infizierten Zelllysaten zu erkennen, bei der Zelllinie CEA $\Delta$ IgC jedoch komplett abwesend. Da der Antikörper nicht in der Lage ist, CEA $\Delta$ IgC zu erkennen, liegt der Schluss nahe, dass das zusätzliche phosphorylierte Protein ein Resultat der Vernetzung von CEA und der dadurch hervorgerufenen Signaltransduktion ist. Damit ist gezeigt, dass die Vernetzung funktioniert und zur Signalweiterleitung über die CEA-Zusammenlagerung geführt hat. In Infektionen ohne antikörpervermittelte Vernetzung ist das zusätzlich phosphorylierte Protein jedoch nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Das deutet daraufhin, dass HopQ durch die Bindung an CEA nicht zu einer Zusammenlagerung der Rezeptoren führt. Des Weiteren scheint die CagA-Translokation von der Vernetzung unabhängig zu sein.

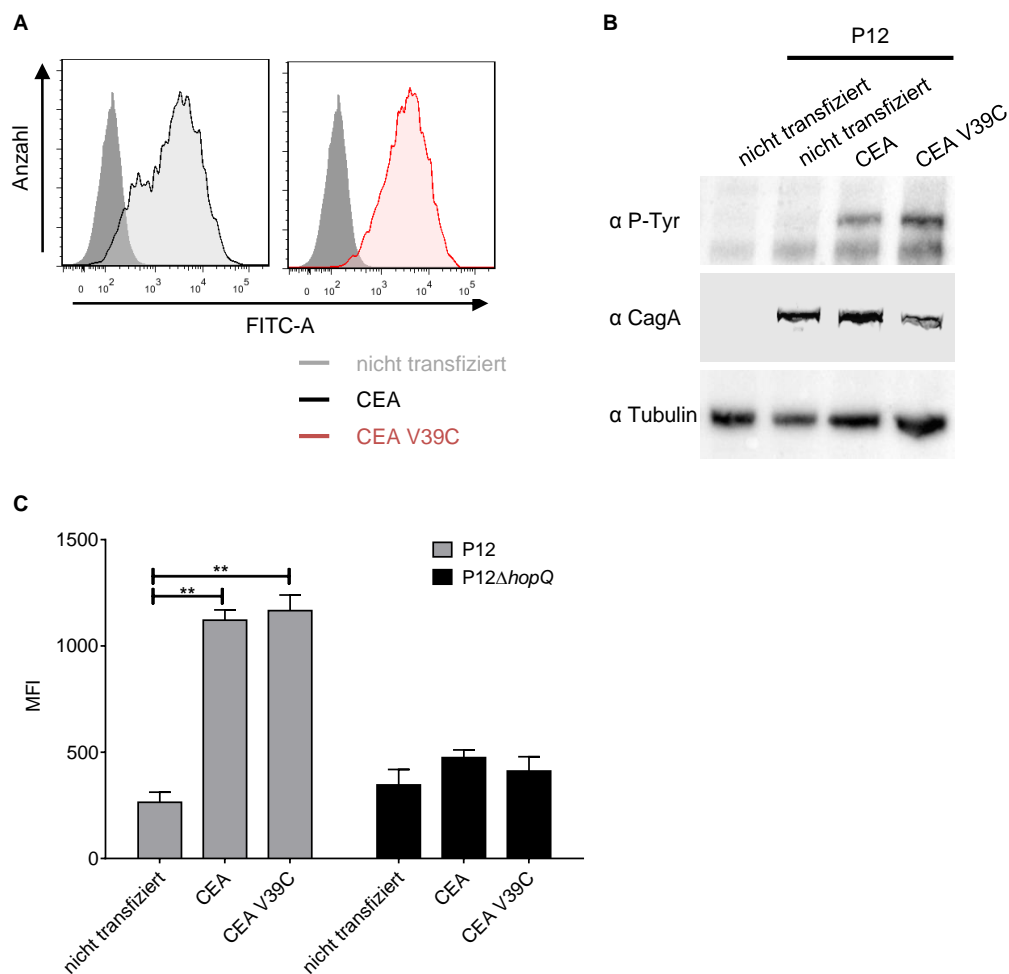
### 3.3.5 Einfluss einer kovalenten CEA-Dimerisierung auf die Bindung und CagA-Translokation von *H. pylori*

CEACAMs können sowohl parallel (Moleküle der gleichen Zelle) als auch antiparallel (Moleküle benachbarter Zellen) homo- und heterophile Bindungen eingehen. Eine Trennung der Bindungen zwischen CEACAMs kann für pathogene Bakterien eine entscheidende Rolle spielen, um beispielsweise einen epithelialen Zellverbund aufzuspalten. Gezeigt wurde dies für die Dr-Adhäsine von *E. coli*, die zu einer Dissoziation von CEA führen (Korotkova *et al.* 2008a). Eine kovalente Verknüpfung der IgV-Domänen von CEA kann durch Einführung eines Cysteins an der Aminosäureposition V39 erreicht werden. Dabei bildet sich zwischen zwei IgV-Domänen

eine Disulfidbrücke aus. Das entstandene Dimer ähnelt der nativen Dimer-Struktur von CEA (Korotkova *et al.* 2008a). Das DraE Adhäsın von *E. coli* kann in Folge der kovalenten Dimerisierung nicht mehr an CEA binden.

In den nächsten Experimenten sollte geklärt werden, ob HopQ ebenfalls zu einer Dissoziation von CEA führt. Dazu wurde mittels gerichteter Mutagenese das Valin an Aminosäureposition 39 gegen ein Cystein ausgetauscht. Das Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft, in HEK-293-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend mittels FACS sortiert. Das mutierte CEA war auf der Oberfläche der sortierten HEK-293 zu detektieren (Abb. 3.20, A). Die Zellpopulation ist homogen, das heißt alle Zellen produzieren CEA V39C auf der Zelloberfläche in ungefähr gleichen Mengen. Daraufhin wurde diese Zelllinie mit *H. pylori* P12 infiziert. Zusätzlich wurden nicht transfizierte und CEA-produzierende HEK-293-Zellen als Kontrolle verwendet. Die Effizienz der CagA-Phosphorylierung in den CEA V39C-Zellen ist in dem gezeigten Western-Blot etwas stärker als bei den CEA-produzierenden Zellen (Abb. 3.20, B). Diese Tendenz konnte jedoch in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Es ist also davon auszugehen, dass die Mutation und die wahrscheinlich daraus resultierende Dimerisierung des CEA, zu keiner Änderung in der CagA-Translokationseffizienz führt. Des Weiteren ist kein Unterschied in der Adhärenz von *H. pylori* an membranständiges CEA oder CEA V39C zu erkennen (Abb. 3.20, C), aber jeweils ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen. P12 $\Delta$ hopQ bindet an alle drei Zelllinien gleich stark (Abb. 3.20, C).

Die durch die Mutation hervorgerufene Dimerisierung wurde daraufhin zusätzlich auch in CEA $\Delta$ IgC durchgeführt. Nach der Klonierung wurde das Konstrukt mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit überprüft und anschließend in HEK-293-Zellen transfiziert. Dem folgte die durchflusscytometrische Überprüfung der Produktion des veränderten CEA $\Delta$ IgC auf der Oberfläche. Die Messung zeigte, dass auf der Oberfläche aller Zellen die gleiche Menge an CEA $\Delta$ IgC V39C detektierbar war (Abb. 3.21, A), wodurch sich eine Sortierung der Zellen erübrigte. Die Infektion der Zelllinie mit *H. pylori* P12 wies im Vergleich zu CEA $\Delta$ IgC-produzierenden Zellen eine ähnliche CagA-Phosphorylierung auf. Das heißt, die Mutation V39C hat im verkürzten CEA genauso wie im vollständigen Protein keinen Einfluss auf die CagA-Translokation (s. Abb. 3.21, B).



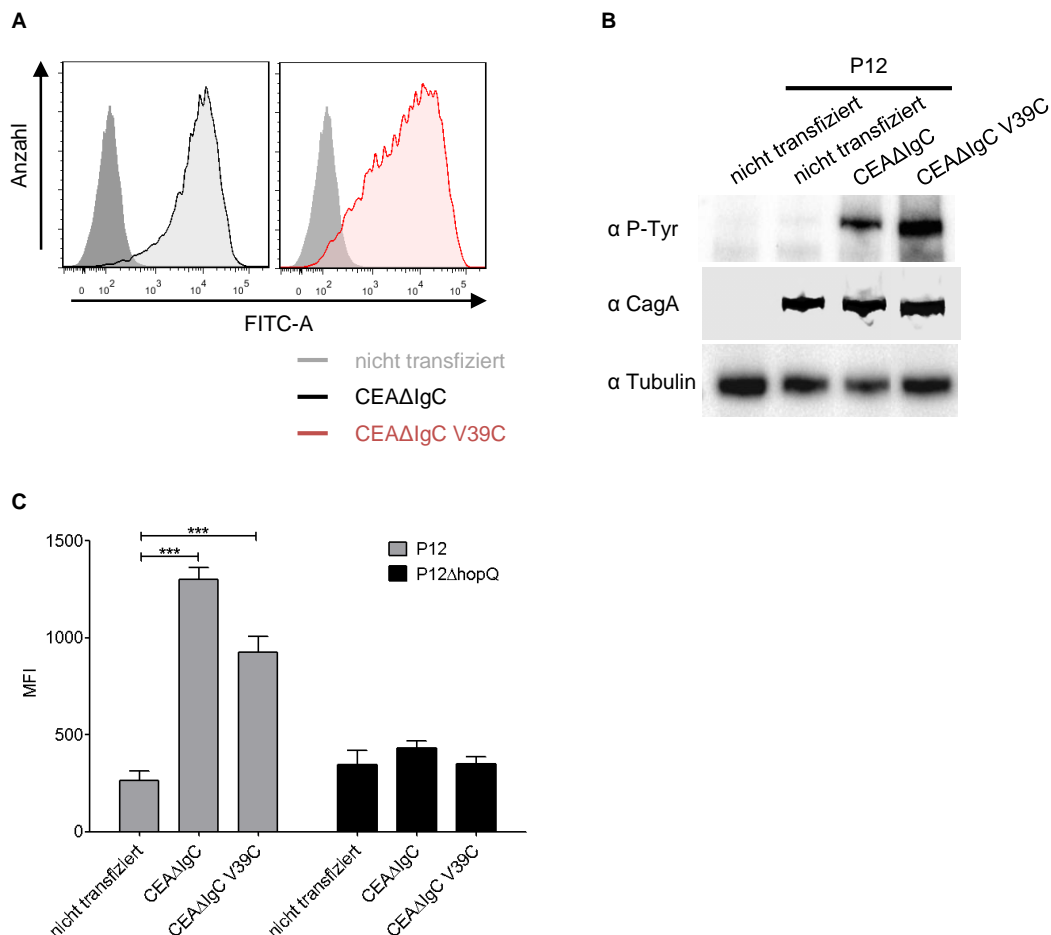
**Abb. 3.20: Produktion des Dimers CEA V39C in HEK-293-Zellen und dessen Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von *H. pylori*.**

(A) Graphische Darstellung der CEA-Proteine auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen nach dem Sortieren mittels FACS. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA ( $\alpha$  CEA) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme). (B) Die HEK-293-Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 bei einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA, phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) und Tubulin als Ladekontrolle im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (C) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ an HEK-293-Zellen mit CEA bzw. CEA V39C. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärenen *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Die Affinität der Bindung von *H. pylori* P12 an CEA $\Delta$ IgC V39C-produzierende Zellen ist im Vergleich zu CEA $\Delta$ IgC reduziert (Abb. 3.21, C). Jedoch bindet *H. pylori* P12 signifikant besser an CEA $\Delta$ IgC bzw. die V39C-Mutante im Vergleich zu den nicht transfizierten HEK-293-Zellen. Der Unterschied zwischen CEA $\Delta$ IgC und CEA $\Delta$ IgC V39C kann einerseits an der Punktmutation an sich, andererseits an der Menge des Proteins auf der Zelloberfläche liegen. Die Graphen der CEA $\Delta$ IgC V39C-Zellen



zeigen eine Kurve, die breiter in der Fluoreszenzintensität ist als die der CEAΔIgC-Zelllinie. Das bedeutet, dass die Varianz der CEA-Menge auf der Oberfläche der Zellen hier höher ist und sich somit insgesamt weniger Protein auf der Oberfläche befindet (vgl. Abb. 3.21, A).

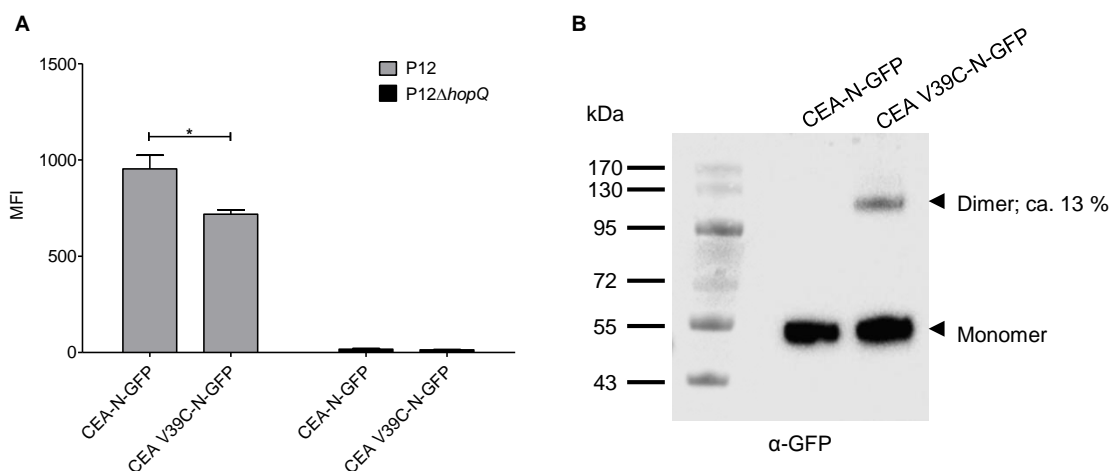


**Abb. 3.21: Produktion von CEAΔIgC V39C in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von *H. pylori*.**

(A) Graphische Darstellung der CEA-Moleküle auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA ( $\alpha$  Pan-CEACAM) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme). (B) Die HEK-293-Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 bei einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA, phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) und Tubulin als Ladekontrolle im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (C) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ an membranständiges CEAΔIgC bzw. CEAΔIgC V39C. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhären *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Die Dimerisierung der CEA-Moleküle durch die Punktmutation wurde bisher nur mit löslichem CEA gezeigt (Korotkova *et al.* 2008a). Daher stellt sich die Frage, ob die

Lokalisation auf der Zelloberfläche nicht zu einer vollständigen Dimerisierung führt. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten die direkte Bindung von *H. pylori* an lösliches kovalentes CEA $\Delta$ IgV-Dimer untersucht. Dazu wurden CEA-N-GFP bzw. das gleiche Protein mit dem V39C Austausch in HEK-293-Zellen hergestellt und in den Überstand sekretiert. Die Mengen der CEA-Proteine im Überstand wurden mittels Western-Blot bestimmt, so dass gleiche Mengen CEA in den *Pull-down*-Experimenten eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ mit den Zellkulturüberständen inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde die Fluoreszenz der Bakterien im Durchflusscytometer bestimmt. Je mehr CEA-N-GFP an die Bakterien gebunden ist, desto stärker ist die gemessene Fluoreszenz der Bakterien. Das Diagramm zeigt eine deutliche Bindung von CEA-N-GFP an die Bakterien, die verloren geht, wenn *hopQ* deletiert ist (Abb. 3.22, A). Die kovalente Dimerisierung von CEA-N führt zu einer signifikanten Reduktion der Bindungsaffinität von *H. pylori* P12 um ca. 25 %. Die verbleibende Interaktion ist ebenfalls HopQ-abhängig. Die verringerte Bindung deutet darauf hin, dass die oben beschriebene Reduktion der Adhäsion von *H. pylori* an die CEA $\Delta$ IgC V39C-Zelllinie auf die Mutation und nicht auf die Produktion des CEA $\Delta$ IgC V39C-Proteins zurückzuführen ist (s. o. und Abb. 3.21, C).



**Abb. 3.22: Pull-down-Experiment mit löslichen CEA-N-GFP und CEA V39C-N-GFP.**

(A) *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ wurden mit Zellkulturüberstand inkubiert, der entweder CEA-N-GFP oder CEA V39C-N-GFP enthielt. Nach mehrmaligen Waschen wurde das mit den Bakterien assoziierte GFP im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). (B) Western-Blot Analyse der Zellkulturüberstände mit CEA-N-GFP und CEA V39C-N-GFP unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP.

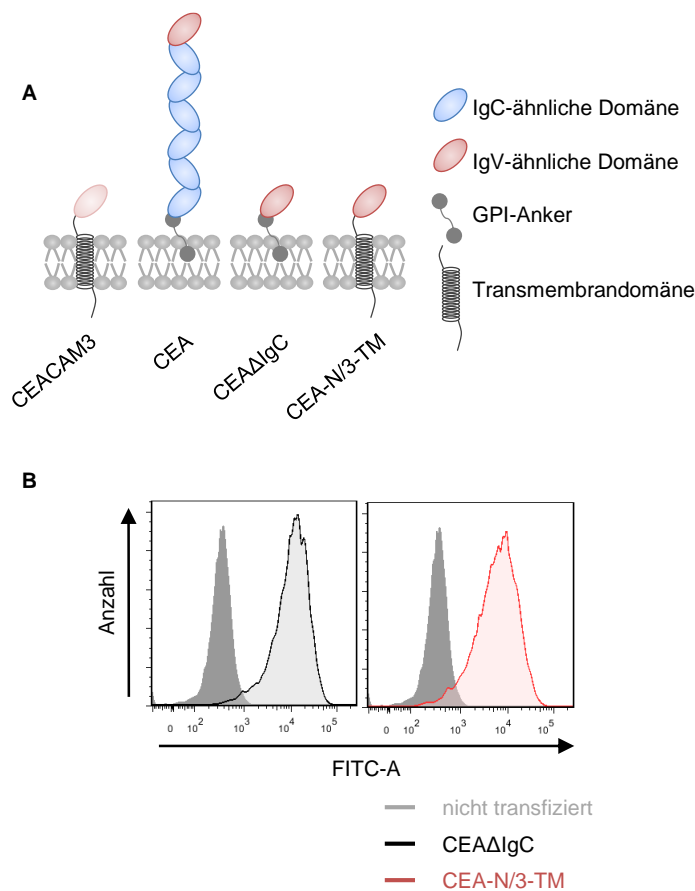
Zur Überprüfung der Dimerisierung wurden die Zellkulturüberstände in einem Western-Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen mit spezifischem Antikörper gegen GFP analysiert. Der Blot zeigt, dass nur ca. 13 % des CEA V39C-N-GFP als Dimer vorliegen (Abb. 3.22, B). Eine vollständige kovalente Dimerisierung wurde hier durch die Punktmutation V39C also nicht erreicht, was einen Einfluss auf die beschriebenen

Ergebnisse haben kann. Eine vollständige Dimerisierung von CEA V39C würde vermutlich einen stärkeren Effekt auf die Bindung von *H. pylori* an die transfizierten HEK-293-Zellen sowie auf das *Pull-down*-Experiment haben.

### 3.3.6 Untersuchung der Funktion der GPI-Verankerung von CEA im Hinblick auf die CagA-Translokation von *H. pylori*

Der GPI-Anker sorgt für die Lokalisierung von CEA in *Lipid-rafts*, den cholesterinreichen Mikrodomänen der Cytoplasmamembran. Sie enthalten ein bestimmtes Set an Proteinen, das durch Stimulierung verändert werden kann. Proteine die nicht in *Lipid-rafts* lokalisiert sind, können unter bestimmten Bedingungen mit diesen assoziieren. Andere Proteine wiederum sind so in der Membran verankert, dass sie unter keinen Umständen in cholesterinreiche Mikrodomänen lokalisieren. Während CEACAM1 beispielsweise unter bestimmten Bedingungen in *Lipid-rafts* lokalisiert, geschieht dies bei CEACAM3 dagegen nicht (Muenzner *et al.* 2008). Die Transmembrandomäne von CEACAM1 determiniert die Assoziation mit den cholesterinreichen Mikrodomänen. Ein Austausch der Transmembrandomäne von CEACAM1 mit der von CEACAM3 führt zu einem anderen Aufnahmemechanismus von *N. gonorrhoeae* bei einer Infektion (Muenzner *et al.* 2008). Die bisherigen Daten von Verena Königer zeigten eine Bindung von *H. pylori* an lösliches CEACAM1-N-GFP und CEA-N-GFP, aber nicht an CEACAM3-N-GFP (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Lokalisierung der Proteine in der Cytoplasmamembran, die gegebenenfalls auch die CagA-Translokation beeinflusst, könnte für *H. pylori* von Vorteil sein.

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die Lokalisierung von CEA in *Lipid-rafts* für die Translokation von CagA eine Rolle spielt, wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem die Transmembrandomäne von CEACAM3 an die IgV-Domäne von CEA fusioniert war. Das in Zellen produzierte CEA (CEA-N/3-TM) ist somit über die Transmembrandomäne von CEACAM3 in der Membran verankert anstatt über einen GPI-Anker. Aus diesem Grund sollte das Molekül die gleiche Membranlokalisierung wie CEACAM3 aufweisen (Abb. 3.23, A). Nach Klonierung der Chimäre wurde diese mittels Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft und anschließend in HEK-293-Zellen transfiziert. Dem folgte die Analyse der Menge des chimären Proteins auf der Oberfläche der Zellen im Durchflusscytometer. Das Ergebnis zeigte, dass alle Zellen CEA-N/3-TM in ungefähr der gleichen Menge auf der Oberfläche besitzen (Abb. 3.23, B).

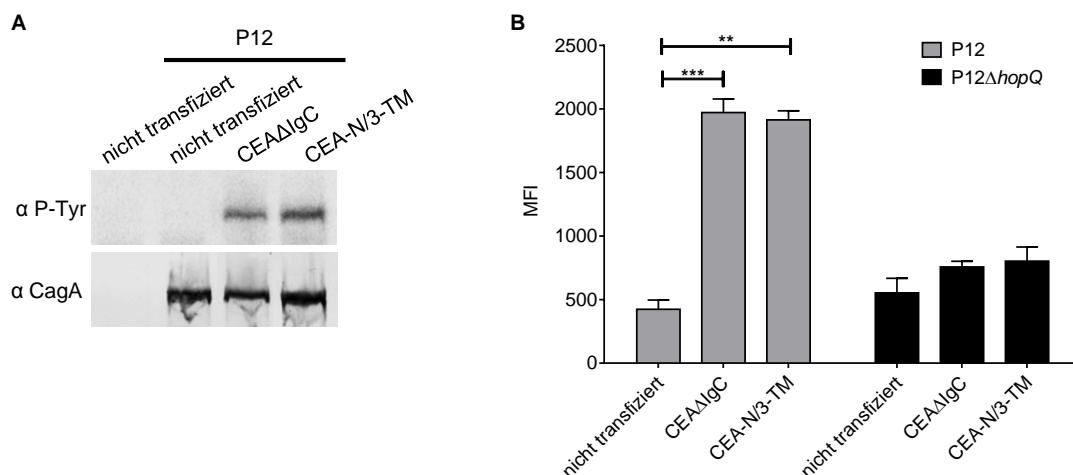


**Abb. 3.23: Schematische Darstellung von CEA-N/3-TM und die Produktion in HEK-293-Zellen.**

(A) Schematische Darstellung von CEAΔIgC bzw. CEA-N/3-TM im Vergleich zum natürlichen CEA und CEACAM3. CEACAM3 unterscheidet sich von CEA-N/3-TM nur in der Sequenz der IgV-ähnlichen Domäne (B) Graphische Darstellung von CEA auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA ( $\alpha$  Pan-CEACAM) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme)

Erstaunlicherweise führt die Infektion der Zelllinie mit *H. pylori* P12 zu einer CagA-Phosphorylierung. Die Effizienz ist vergleichbar mit HEK-293-Zellen die CEAΔIgC produzieren, also GPI-verankertes CEA-N (Abb. 3.24, A). In der Adhärenz von *H. pylori* an die CEA-N/3-TM-produzierende Zelllinie ist kein Unterschied zu dem CEAΔIgC-Protein zu detektieren (Abb. 3.24, B). Dies war aufgrund der gleichen IgV-Domäne zu erwarten. Die Bindung an die CEA transfizierten HEK-293-Zellen ist auch hier abhängig von HopQ.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die CagA-Translokation unabhängig von der durch die Verankerung determinierten zellulären Lokalisation des CEA zu sein scheint.



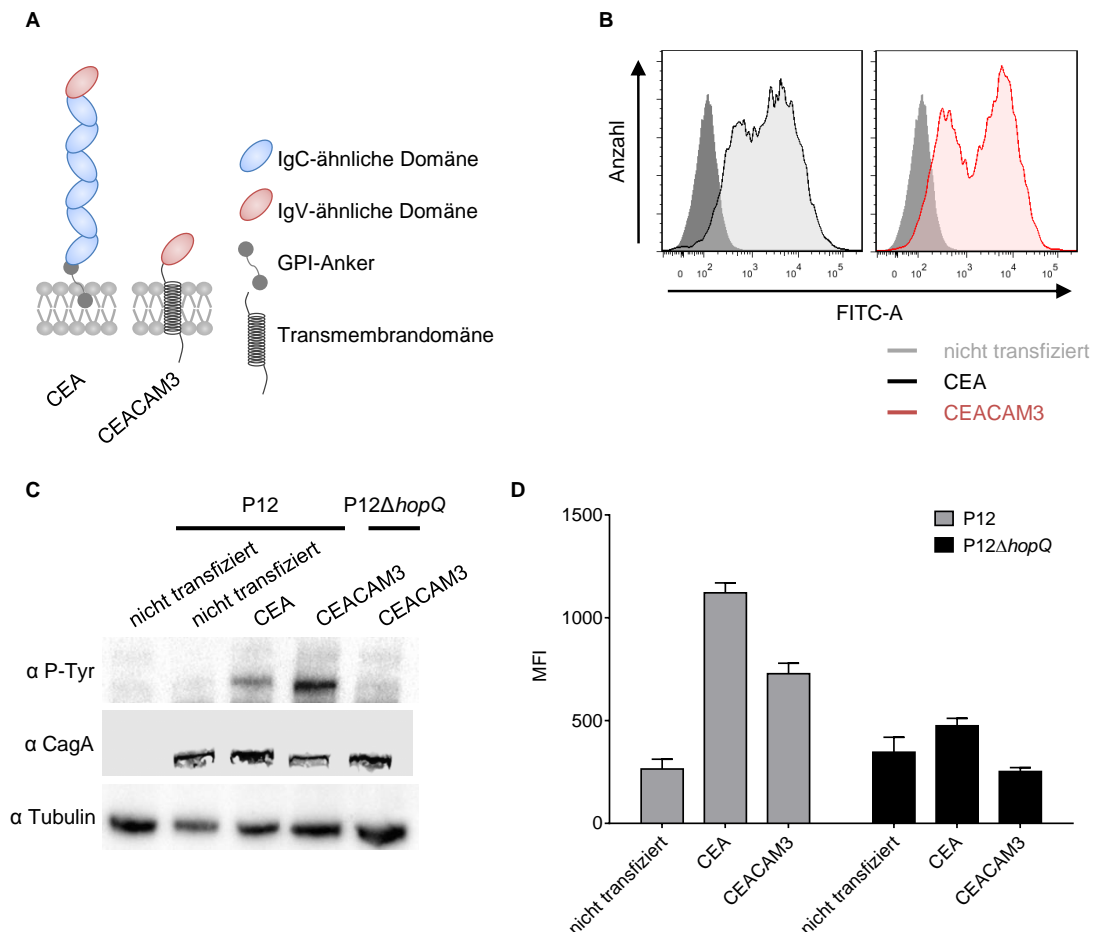
**Abb. 3.24: CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experiment und Adhäsion von *H. pylori* an CEA-N/3-TM-produzierende HEK-293-Zellen.**

(A) Die HEK-293 Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 für 4 Stunden und einer MOI von 60 infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA und phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (B) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ an HEK-293-Zellen mit CEA $\Delta$ IgC bzw. CEA-N/3-TM. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärennten *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Als Kontrolle des vorherigen Experiments wurden stabil CEACAM3-produzierende HEK-293-Zellen hergestellt, da *H. pylori* an dieses Molekül nicht binden sollte und somit auch kein CagA translozieren kann (Abb. 3.25, A). Nach der Transfektion zeigte die Analyse im Durchflusscytometer das ca. 50 % der Zellen CEACAM3 auf der Oberfläche haben (Abb. 3.25, B). Die andere Hälfte der Zellen produziert nur wenig bis gar kein CEACAM3. Erstaunlicherweise führt eine Infektion dieser Zellen mit *H. pylori* P12 zu einer HopQ-abhängigen CagA-Phosphorylierung (Abb. 3.25, C). Das war nicht zu erwarten, da *H. pylori* in den *Pull-down*-Experimenten mit löslicher IgV-Domäne von CEACAM3 keine Bindung aufwies (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Menge des phosphorylierten CagA scheint bei den Zellen mit CEACAM3 als Rezeptor höher im Vergleich zu CEA (Abb. 3.25, C). Diese Beobachtung konnte jedoch bei Wiederholungen des Experiments nicht gezeigt werden. Zusätzlich war dieser Unterschied in Experimenten mit transient transfizierten HEK-293-Zellen nicht zu erkennen (s. 3.3.7).

In den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit korrelierte die CagA-Phosphorylierung immer mit einer erhöhten Adhärenz an die CEA-produzierenden Zellen. Dies wurde also auch für CEACAM3 erwartet, obwohl die *Pull-down*-Experimente mit löslicher IgV-Domäne von CEACAM3 keine Bindung aufwiesen. Das anschließend durchgeführte Adhärenzexperiment mit membranständigen CEACAM3 auf HEK-293-Zellen bestätigte, dass *H. pylori* eine HopQ-abhängige höhere Bindungsaffinität an diese Zellen zeigt, als an die nicht transfizierten Zellen (Abb. 3.25, D). Die Bindung an CEACAM3 ist jedoch

etwas geringer als die an CEA. Diese Beobachtung kann aber daran liegen, dass nur ca. 50 % der Zellen CEACAM3 produzieren (s. Abb. 3.25, B).



**Abb. 3.25: Produktion von CEACAM3 in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von *H. pylori*.**

(A) Schematische Darstellung von CEA und CEACAM3. (B) Graphische Darstellung von CEACAM3 bzw. CEA auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEACAM (α Pan-CEACAM) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme). (C) Die HEK-293 Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 bei einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA, phosphoryliertes CagA (α P-Tyr) und Tubulin als Ladekontrolle im Western-Blot analysiert. (D) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ an HEK-293-Zellen mit CEA bzw. CEACAM3. Die Zellen wurden für 1 h mit einer MOI von 60 infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhären *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

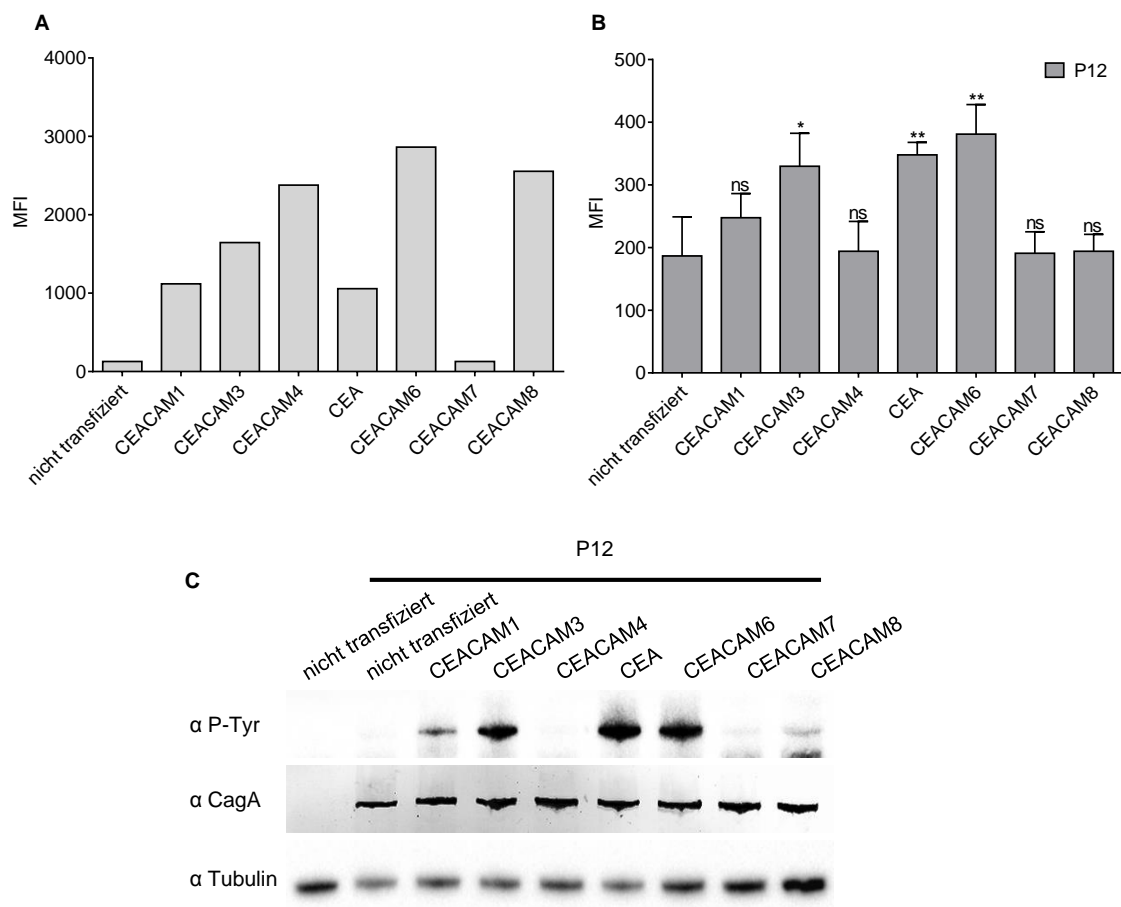
Die CagA-Phosphorylierung scheint also auch bei CEACAM3 in direkten Zusammenhang mit einer HopQ-abhängigen Adhäsion an dieses auf den Zellen exponierte Molekül zu stehen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *H. pylori* im zellulären Kontext HopQ-abhängig an CEACAM3 bindet. Aufgrund dessen ist es auch

nicht überraschend, dass der Austausch des GPI-Ankers von CEA mit der Transmembrandomäne von CEACAM3 keinen Effekt auf die CagA-Translokation hatte.

### 3.3.7 Verifizierung der *H. pylori*-CEACAM Interaktion im zellulären Kontext

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des *Pull-down*-Experiments mit löslichen IgV-Domänen von CEACAMs (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung), in denen *H. pylori* nur an CEA und CEACAM1 aber nicht an CEACAM3, 4, 6, 7, und 8 bindet, und dem Adhärenz-Experiment mit CEACAM3-produzierenden HEK-293-Zellen (3.3.6) wirft die Frage auf, ob *H. pylori* im zellulären Kontext auch an CEACAM4, 6, 7 oder 8 binden kann.

Um diese Frage zu klären wurden HEK-293-Zellen mit CEACAM1, 3, 4, 6, 7, 8 und CEA transient transfiziert. Die Evaluation der Proteinproduktion im Durchflusscytometer zeigte für alle Konstrukte bis auf CEACAM7 ein Signal (Abb. 3.26, A). Für die Detektion von CEACAM7 wurde ein Antikörper von 1997 (Cac<sub>2</sub>) verwendet (Thompson *et al.* 1997). Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Antikörpers gab es aber keine geeignete positive Kontrolle. Es ist also einerseits möglich, dass CEACAM7 auf der Oberfläche vorhanden ist, jedoch mit dem verwendeten Antikörper nicht detektiert werden kann. Andererseits ist denkbar, dass die Transfektion nicht zu einer Synthese von CEACAM7 geführt hat. Die Produktion der CEACAMs nach der Transfektion ist unterschiedlich stark (Abb. 3.26, A) und auch die Transfektionsrate variierte zwischen den Konstrukten (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von *H. pylori* P12 wurde für alle Zellen getestet. Überraschenderweise führte neben CEACAM1, 3 und CEA auch die Produktion von CEACAM6 zu einer signifikant höheren Bindung von *H. pylori* P12 an HEK-293-Zellen im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle (Abb. 3.26, B). Die Bindung an CEACAM1 ist bei den Experimenten mit transient transfizierten Zellen, nicht signifikant stärker als an die nicht transfizierten Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die geringe Transfektionsrate (ca. 23 %, Daten hier nicht gezeigt) und die niedrige Menge von CEACAM1 auf der Oberfläche der Zellen (Abb. 3.26, A), denn für stabil transfizierte CEACAM1-produzierende Zellen konnte eine signifikant höhere Bindungsaffinität gegenüber der Kontrolle gezeigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Des Weiteren hat *H. pylori* eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu CEA-N-GFP als CEACAM1-N-GFP (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Diese höhere Affinität kann der Grund sein, warum die Bindung an CEA-produzierende Zellen signifikant im Vergleich zu der nicht transfizierten Kontrolle ist, obwohl die Menge auf der Oberfläche und die Transfektionsrate ähnlich zu den mit CEACAM1 transfizierten Zellen sind.



**Abb. 3.26: Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit CEACAM1, 3, 4, 6, 7, 8 bzw. CEA.** (A) Bestimmung der CEACAMs auf der Zelloberfläche. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEACAM (CEACAM1, 3, 4, 5 und 6:  $\alpha$  Pan-CEACAM; CEACAM7: *Cac2* (Thompson *et al.* 1997); CEACAM8: LT-3AG-B2) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die MFI eines repräsentativen Experiments. (B) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 an die transient transfizierten HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärenen *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Anova und Dunnett's multiplem Vergleich als Post-hoc-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C) Die HEK-293-Zellen wurden mit *H. pylori* P12 für 4 Stunden und einer MOI von 60 infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA, phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) und Tubulin als Ladekontrolle im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Ergebnisse des Bindungsexperiments zeigen, dass *H. pylori* die gleiche Adhäsion an nicht transfizierte Zellen und Zellen, die mit CEACAM4, 7 bzw. 8 transfiziert sind aufweist. Das deutet daraufhin, dass *H. pylori* nicht an CEACAM4, 7 bzw. 8 binden kann. Die Zellen wurden zusätzlich auf die Fähigkeit von *H. pylori*, CagA zu translokieren, untersucht. Phosphoryliertes CagA ist nur in Zellen mit CEACAM1, 3, 6 und CEA detektierbar (Abb. 3.26, C). Die CagA-Translokation korreliert also mit den aus dem Adhärenzexperiment gewonnenen Daten. Die Phosphorylierung von CagA ist sowohl in Zellen mit CEACAM3 als auch CEACAM6 HopQ-abhängig (3.3.6, Daten nicht gezeigt).



Zusammenfassend zeigt *H. pylori* im zellulären Kontext eine HopQ-abhängige Adhärenz an CEACAM1, 3, 6 und CEA, die mit der CagA-Translokation in diese Zellen korreliert. Zusätzlich zu den durch *Pull-down*-Experimente entdeckten Rezeptoren CEA und CEACAM1 (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung) demonstrieren diese Ergebnisse eine HopQ-abhängige Bindung an CEACAM3 und CEACAM6, die mit den löslichen CEACAM-N-GFP-Proteinen zuvor nicht gezeigt werden konnte.

### 3.3.8 Die Bedeutung der Aminosäuren R43 und Q44 im CEA für eine HopQ-abhängige Bindung von *H. pylori*

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des *Pull-down*-Experiments mit löslichen CEACAM-N-GFP-Proteinen und den membranständigen CEACAMs auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen legte nahe, die Aminosäuresequenzen der IgV-Domänen von CEACAM1, 3, 6 und CEA genauer zu betrachten. Der Vergleich zeigt, dass die Aminosäuresequenzen dieser vier CEACAMs sehr ähnlich sind. CEA und CEACAM3 haben im Vergleich zu CEACAM1 zwölf Aminosäureaustausche und CEACAM6 elf (Abb. 3.27). Auffällig sind die Aminosäurepositionen 43 und 44, denn das sind die einzigen Positionen, die sich zwischen CEACAM1/CEA bzw. CEACAM3/6 unterscheiden. Diese Aminosäuren (AS) befinden sich in der GFCC`C`` Seite der IgV-Domäne und sind für die homophile Zelladhäsion mit verantwortlich (Taheri *et al.* 2000, Watt *et al.* 2001, Markel *et al.* 2004). Des Weiteren sind die AS R43 und Q44 für die Interaktionen von CEACAM1 mit anderen Molekülen notwendig (Markel *et al.* 2004). Für CEA wurde gezeigt, dass der Austausch von Q44 zu Leucin die Selbstassoziation verändert. Die lösliche CEA IgV-Domäne liegt in diesem Fall als Monomer statt als Dimer vor (Korotkova *et al.* 2008a).

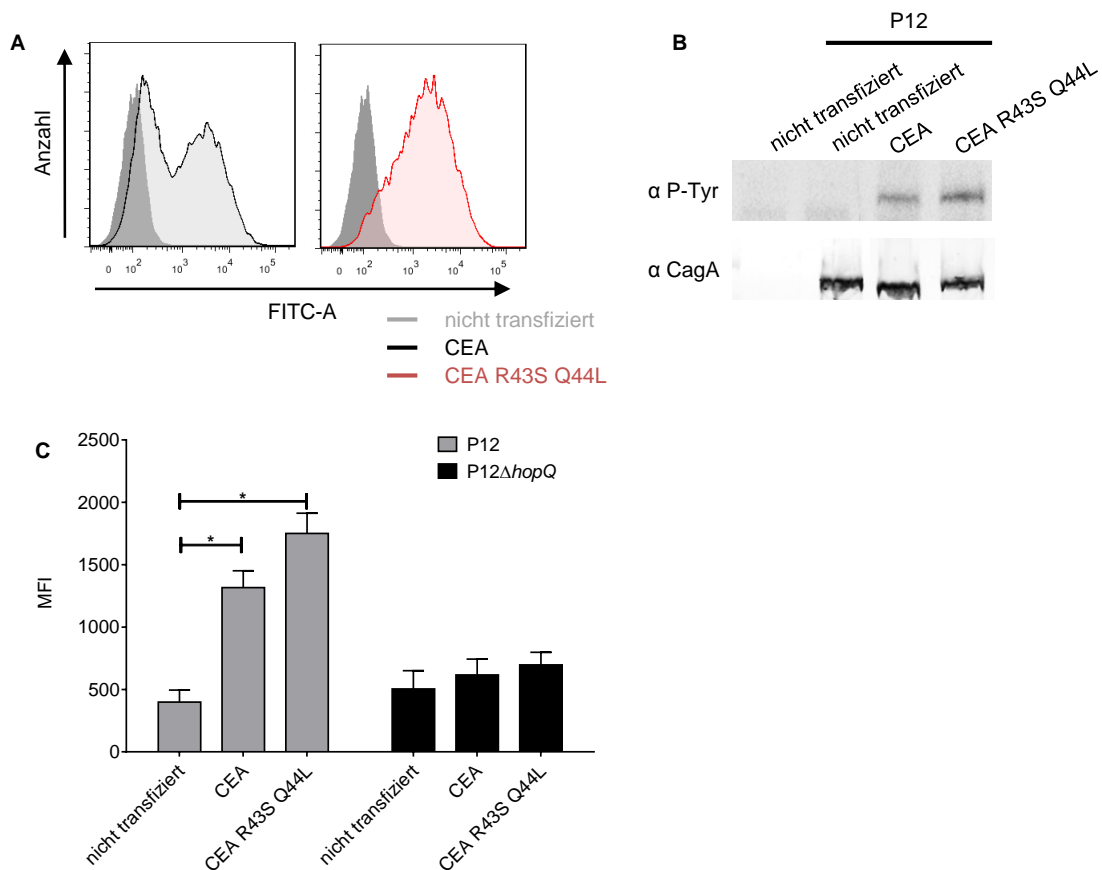
		20		40		60
CEACAM1	QLTIESMPFN	VAEGKEVLLL	VHNLPPQLFG	YSWKGERVD	GNRQIVGYAI	GTQQATPGPA 60
CEA	KLTIESIPFN	VAEGKEVLLL	VHNLPPQLFG	YSWKGERVD	GNRQIVGYVI	GTQQATPGPA 60
CEACAM3	KLTIESMPIS	VAEGKEVLLL	VHNLPPQLFG	YSWKGERVD	GNSLIVGYVI	GTQQATPGAA 60
CEACAM6	KLTIESIPFN	VAEGKEVLLL	AHNLPPNRIG	YSWKGERVD	GNSLIVGYVI	GTQQATPGPA 60
		80		100		
CEACAM1	MSGRETIYPN	ASLLIQNVTV	NDTGFYTLQV	IKSDLVNEEA	TGQFHVY	107
CEA	YSGRETIYPN	ASLLIQNVTV	NDTGFYTLHV	IKSDLVNEEA	TGQFHVY	107
CEACAM3	YSGRETIYIN	ASLLIQNVTV	NDIGFYTLQV	IKSDLVNEEA	TGQFHVY	107
CEACAM6	YSGRETIYPN	ASLLIQNVTV	NDTGFYTLQV	IKSDLVNEEA	TGQFHVY	107

**Abb. 3.27: Aminosäuresequenzvergleich der IgV-Domänen von CEACAM1, CEA, CEACAM3 und CEACAM6.**

Das Alignment der IgV-Domänen von CEACAM1, 3, 6 und CEA wurde mit dem Programm CLC Workbench generiert. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind schwarz hinterlegt. CEA und CEACAM3 haben zwölf und CEACAM6 hat elf unterschiedliche AS im Vergleich zu CEACAM1. CEACAM1 und CEA haben an der AS Position 43 und 44 ein Arginin und ein Glutamin, wodurch sie sich gemeinsam von CEACAM3 und CEACAM6 unterscheiden, die an diesen Positionen Serin und Leucin besitzen.

Deshalb sollte im Folgenden die Frage geklärt werden, ob die AS an den Positionen 43 und 44 von CEACAM3 bzw. CEACAM6 dafür verantwortlich sind, dass *H. pylori* nicht an die löslichen CEACAM-N-GFP-Proteine binden kann. Dazu wurde zunächst eine

gerichtete Mutagenese im CEA zum Austausch der Aminosäuren R43 und Q44 gegen Serin und Leucin, den entsprechenden AS von CEACAM3/6 durchgeführt. Nach Verifizierung der korrekten Mutation durch Sequenzierung und der Transfektion des Konstruktes wurden die Zellen selektiert und mittels FACS sortiert. Die Menge des mutierten CEA auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen wurde während der Experimente im Durchflusscytometer überprüft (Abb. 3.28, A).



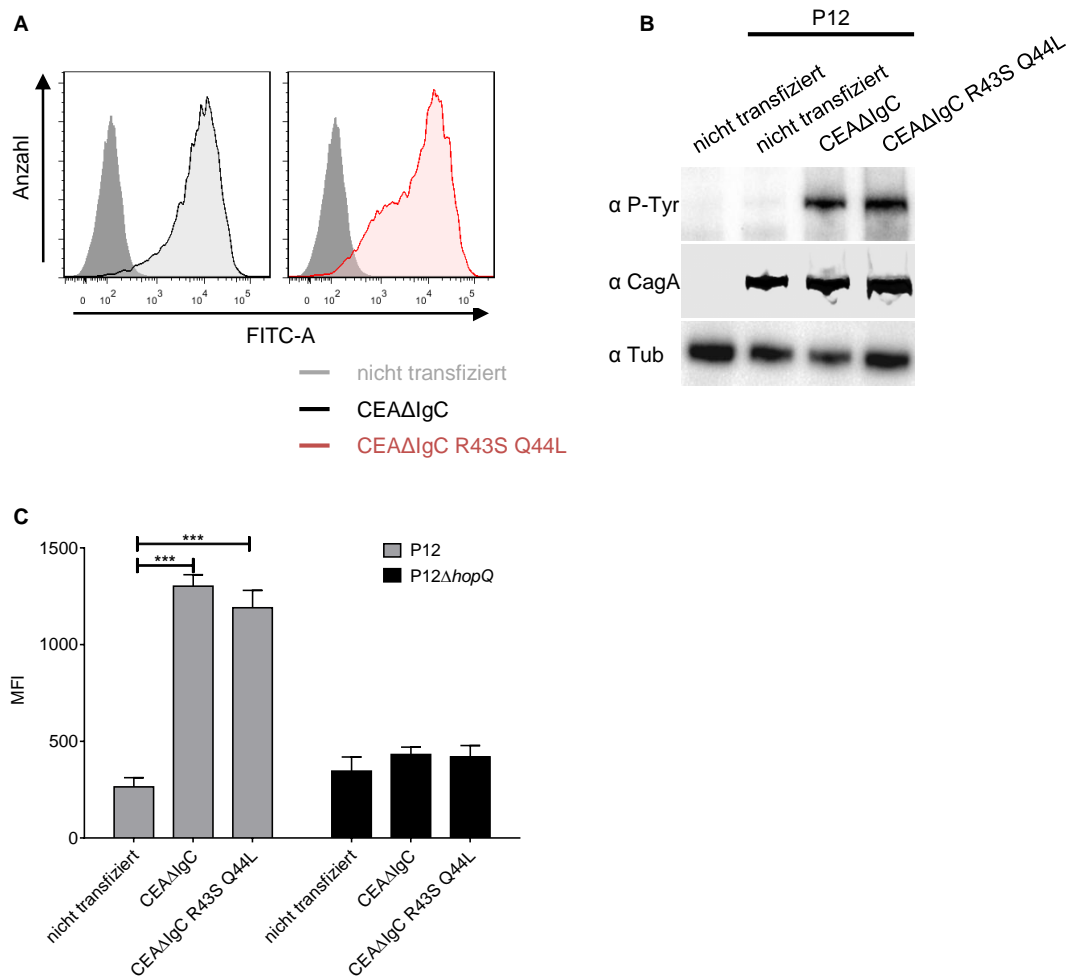
**Abb. 3.28: Produktion von CEA R43S Q44L in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von *H. pylori*.**

(A) Graphische Darstellung von CEA auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEA ( $\alpha$  CEA) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme). (B) Die HEK-293-Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 mit einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA und phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (C) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ an membranständiges CEA bzw. CEA R43S Q44L auf HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärenen *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

Die gesamte Zellpopulation zeigt die Produktion von CEA R43S Q44L auf der Oberfläche in ungefähr der gleichen Menge (Abb. 3.28, A). In der darauffolgenden Infektion der Zellen mit *H. pylori* P12 zeigt sich, dass eine CagA-Translokation trotz der Punktmutationen möglich ist (Abb. 3.28, B). Die Effizienz war vergleichbar mit der von Wildtyp-CEA. Die HopQ-abhängige Adhärenz an CEA R43S Q44L-produzierende HEK-293-Zellen ist stärker als an nicht mutiertes CEA (Abb. 3.28, C). CEA ist aber nur bei ca. 50 % der Zellen auf der Oberfläche detektierbar im Gegensatz zu 100 % der CEA R43S Q44L-Zellen (Abb. 3.28, A). Der Unterschied in der Adhärenz kann also auf die Proteinmengen zurückgeführt werden.

Die IgC-Domänen unterstützen die interzelluläre Bindung zwischen CEA-Molekülen (Zhou *et al.* 1993). Um auszuschließen, dass die IgC-Domänen einem potenziellen negativen Effekt der Punktmutationen auf die homophile Zelladhäsion entgegenwirken, wurden die Mutationen R43S und Q44L ebenfalls in dem verkürzten CEAΔIgC eingeführt. Die Richtigkeit der Mutationen wurde vor der Transfektion mittels Sequenzierung überprüft. Die HEK-293-Zellen zeigen nach der Transfektion eine homogene CEAΔIgC R43S Q44L-produzierende Zellpopulation auf (Abb. 3.29, A). Die Proteinmenge ist vergleichbar mit nicht veränderten CEAΔIgC. Die anschließend durchgeführten Infektionsexperimente mit *H. pylori* P12 zeigen, dass auch in HEK-293-Zellen, welche die mutierte Version von CEAΔIgC haben, eine CagA-Phosphorylierung möglich ist (Abb. 3.29, B). Die Effizienz ist dabei vergleichbar mit dem nicht mutierten CEAΔIgC. Des Weiteren bindet *H. pylori* mit der gleichen Affinität an CEAΔIgC R43S Q44L bzw. CEAΔIgC auf HEK-293-Zellen (Abb. 3.29, C). Die Adhärenz ist bei beiden Zelllinien im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen signifikant stärker. Die Bindung von *H. pylori* an die HEK-293-Zellen mit CEAΔIgC ist auch in diesem Fall abhängig von HopQ (Abb. 3.29, C).

Im zellulären Kontext haben die Aminosäuren R43 und Q44 also keinen Einfluss auf die Adhärenz von *H. pylori*, unabhängig von der Funktion der IgC-Domänen. Außerdem wird die CagA-Translokation nicht durch die Mutationen verhindert.

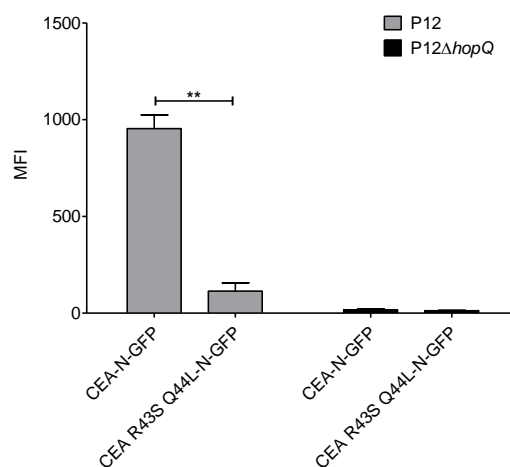


**Abb. 3.29: Produktion von CEAΔIgC R43S Q44L in HEK-293-Zellen und der Einfluss auf die CagA-Translokation und Adhärenz von *H. pylori*.**

(A) Graphische Darstellung von CEA auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CEACAM ( $\alpha$  Pan-CEACAM) und fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper gekennzeichnet. Anschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Zellen gegenüber der Fluoreszenz eines repräsentativen Experiments. Als negative Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mit dem entsprechenden Antikörper markiert (grau ausgefüllte Histogramme). (B) Die HEK-293-Zelllinien wurden mit *H. pylori* P12 mit einer MOI von 60 für 4 Stunden infiziert. Gleiche Mengen der Zelllysate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CagA, phosphoryliertes CagA ( $\alpha$  P-Tyr) und Tubulin als Ladekontrolle im Western-Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (C) Bindung von GFP-produzierenden *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ an HEK-293-Zellen mit CEAΔIgC bzw. CEAΔIgC R43s Q44L. Die Zellen wurden mit einer MOI von 60 für 1 h infiziert, gewaschen und anschließend die Fluoreszenz der Zellen, entsprechend den adhärenen *H. pylori*, im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der MFI von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

Ziel des folgenden Experiments war es herauszufinden, ob die Punktmutationen im CEA einen Einfluss auf die Bindung von *H. pylori* an lösliches CEA-N-GFP haben. Dazu wurde lösliches CEA-N-GFP ebenfalls durch gerichteten Austausch der Basen, die für die Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 codieren, mutiert. Der Überprüfung des Konstrukts mittels Sequenzierung folgte die Transfektion des Expressionsplasmids in

HEK-239-Zellen. Der daraufhin hergestellte Zellkulturüberstand mit löslichem CEA R43S Q44L-N-GFP wurde mit *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ inkubiert. Mehreren Waschschritten folgten die Präzipitation der Bakterien samt gebundener CEA-N-GFP sowie die jeweilige Messung mittels Durchflusscytometer (*Pull-down*). Das Experiment zeigt, dass *H. pylori* P12 nicht in der Lage ist, CEA R43S Q44L-N-GFP mit der gleichen Affinität zu binden wie CEA-N-GFP (Abb. 3.30). Die drastische Reduktion der Bindung ist signifikant ( $p < 0,01$ ). Der Unterschied zwischen P12 Wildtyp und P12 $\Delta$ hopQ in der Bindung von CEA R43S Q44L-N-GFP ist jedoch nicht signifikant ( $p = 0,1$ , Abb. 3.30). Das bedeutet, dass *H. pylori* nicht HopQ-abhängig an lösliches CEA-N-GFP mit den Punktmutationen R43S Q44L binden kann.



**Abb. 3.30: Pull-down-Experiment mit löslichen CEA-N-GFP und CEA R43S Q44L-N-GFP.**

*H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta$ hopQ wurden mit Zellkulturüberstand, der entweder CEA-N-GFP oder CEA R43S Q44L-N-GFP enthielt, inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde das mit den Bakterien assoziierte GFP im Durchflusscytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der MFI von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's T-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Der Austausch dieser zwei AS führt bei CEA also zu unterschiedlichen Ergebnissen bei dem Adhärenzexperiment und den CagA-Tyrosinphosphorylierungs-Experimenten (Abb. 3.28 und Abb. 3.29) im Vergleich zu dem *Pull-down*-Experiment mit löslichem CEA-N-GFP. Der Austausch der Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 im CEA gegen die AS von CEACAM3 bzw. CEACAM6 hat also nur einen Einfluss auf die HopQ-abhängige Bindung von *H. pylori*, wenn das Protein als lösliches GFP-Fusionsprotein vorliegt, aber nicht wenn es auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen exponiert ist. Dieser Unterschied zwischen den verschiedenen Experimenten ist ebenfalls bei CEACAM3 und CEACAM6 zu beobachten (s. 3.3.7), was den Schluss nahelegt, dass Serin und Leucin an den Positionen 43 und 44 dafür verantwortlich sind.

## 4 Diskussion

Bakterien und Viren haben viele verschiedene Mechanismen entwickelt, um dem Abwehrsystem des Wirts zu trotzen. Die Adhäsion ist dabei der grundlegende Mechanismus, die Besiedelung des Wirts zu initiieren. Neben der Anhaftung an die Zellen des Wirtsorganismus dient die Adhäsion in vielen Fällen auch der Übertragung von Signalen.

Bei Neisserien beispielsweise kommt es zunächst zu einer initialen Adhäsion durch Pili und daraufhin zu einer engeren Adhäsion, welche die Aufnahme der Bakterien in Epithelzellen ermöglicht. Der Mechanismus ist dabei abhängig von der Interaktion zwischen Adhäsine und Ligand (Sadarangani *et al.* 2011). Die Endocytose ermöglicht den Bakterien, die epitheliale Barriere zu überwinden und in subepitheliale Bereiche vorzudringen, aber auch die Immunantwort des Wirts zu umgehen.

Die Adhäsion kann zudem bei der Translokation von Virulenzfaktoren in die Wirtszellen hilfreich sein. Zum einen führt die Bindung dazu, dass der Raum zwischen Bakterium und Zelle geringer wird und damit eine Translokation erleichtert werden kann. Zum anderen können durch die Interaktion Signale hervorgerufen werden, welche die Übertragung begünstigen. Beispielsweise wird das Cag-Typ-4-Sekretionssystem von *H. pylori* durch die Adhäsine BabA und HopQ beeinflusst (Ishijima *et al.* 2011, Belogolova *et al.* 2013). Die Identifikation neuer Adhäsine, die im Zusammenhang mit der Translokation des Cytotoxins CagA stehen, war Gegenstand dieser Arbeit. Zudem wurde untersucht, wie die Interaktion zwischen HopQ und CEACAMs zu der Übertragung von CagA in die Wirtszelle beiträgt.

### 4.1 Adhäsine von *H. pylori* und Syndecane als potenzielle Rezeptoren

*H. pylori* besitzt bis zu 60 potenzielle äußere Membranproteine (OMPs), von denen ein großer Teil der Hop-Familie zugeordnet werden kann (Tomb *et al.* 1997, Alm *et al.* 2000). Dennoch sind bis heute erst wenige Funktionen dieser Proteine identifiziert. In der Hop-Familie befinden sich auch die bisher beschriebenen Adhäsine BabA, SabA und LabA (Boren *et al.* 1993, Ilver *et al.* 1998, Mahdavi *et al.* 2002, Rossez *et al.* 2014). Diese drei Adhäsine haben gemeinsam, dass bestimmte Zuckerstrukturen ihre Liganden sind. Es wird vermutet, dass die nahverwandten Hop-Proteine ebenfalls adhäsive Eigenschaften besitzen (s. Abb. 1.6). Die große Anzahl an äußeren Membranproteinen und putativen Adhäsinen ermöglicht *H. pylori* die Anpassung an die unterschiedlichen Wirtsepithelien. Für eine schnelle Anpassung innerhalb des Wirts werden die OMPs zum Teil durch Phasenvariation oder Genkonversion reguliert. Die Phasenvariabilität entsteht durch Dinukleotidsequenzen, die am 5'-Bereich des Gens lokalisiert sind und ihre Anzahl

verändern können, wodurch entweder der korrekte Leserahmen entsteht oder es zu einem verfrühten Abbruch der Translation durch ein Stoppcodon kommt (Peck *et al.* 1999, Posselt *et al.* 2013). Dieser Prozess wird auch als *slipped strand mispairing* bezeichnet. Ein anderer Mechanismus der schnellen Anpassung ist die Genkonversion. Die OPMs besitzen konservierte N- und C-terminale Bereiche, wodurch es häufig zu homologer Rekombination zwischen diesen Genen kommt. Beispielsweise kann *babA* mit *babB* und *babC* rekombinieren, was zu einer Veränderung der Expression führt, die auch Folgen auf die Adhäsion der Bakterien haben kann (Pride und Blaser 2002, Colbeck *et al.* 2006, Hennig *et al.* 2006). Das gleiche konnte für *sabA* und *sabB* beobachtet werden (Talarico *et al.* 2012). Aufgrund dieser schnellen Anpassungsmöglichkeiten sind unterschiedliche Expressionsmuster innerhalb eines Stamms vorhanden, die zu unterschiedlichen Subpopulationen führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Produkt des phasenvariablen Gens *sabB* die CagA-Translokation in AGS-Zellen ermöglicht, wenn HopQ nicht vorhanden ist. Die erfolgreiche Deletion beider *sabB*-Kopien in *H. pylori* P12 führte jedoch nicht zu einer Reduktion der Translokation von CagA. Die zusätzliche Entfernung des HopQ-Proteins hatte eine Verringerung der CagA-Translokation zur Folge, die jedoch der alleinigen Entfernung des HopQs entspricht (s. Abb. 3.1). Daraus ist zu schließen, dass SabB keinen direkten Einfluss auf die CagA-Translokation in AGS-Zellen hat. Die Experimente geben jedoch keinen Aufschluss darüber, ob SabB adhäsive Eigenschaften besitzt. Um die Adhäsion zu untersuchen, sind AGS-Zellen allerdings nicht geeignet, da eine verminderte Adhäsion durch andere Adhäsion-Rezeptor-Paare überlagert werden kann. Beispielsweise führt die Entfernung von BabA nicht zu einer verminderten Adhärenz an AGS-Zellen, obwohl Lewis<sup>b</sup>-Antigene auf den Zellen vorhanden sind (Ishijima *et al.* 2011, Toller *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu ist die Adhärenz von *H. pylori* an Kato-III-Zellen hauptsächlich abhängig von BabA (Toller *et al.* 2011). Ob ein Adhäsionseffekt untersucht werden kann, hängt also von der eingesetzten Zelllinie ab. Am sinnvollsten ist es, eine Zelllinie zu verwenden, an die *H. pylori* nicht gut adhärieren kann und anschließend dort den potenziellen Rezeptor einzufügen, um eine Interaktion untersuchen zu können. Aus diesem Grund eignen sich AGS-Zellen auch nicht dazu, neue Rezeptoren-Liganden-Paare und dessen Auswirkungen auf die CagA-Translokation zu untersuchen. Neben dem Entfernen eines potenziellen Adhäsins und der Untersuchung der darauffolgenden Auswirkungen auf die Adhärenz der Bakterien an verschiedene Zellen kann auch der umgekehrte Ansatz verwendet werden. Dabei wird die Bindung der Bakterien an einen potenziellen Liganden bestimmt.

Denkbar passende Liganden für die Adhäsion von *H. pylori* sind Syndecane. Sie besitzen einen kleinen Proteinanteil und bestehen hauptsächlich aus Heparansulfat-Seitenketten (HS-Ketten). Zum einen Binden andere Bakterien wie beispielsweise Neisserien oder Yersinien an die HS der Syndecane (van Putten und Paul 1995, Boyd *et al.* 1998). Zum anderen wird die Expression von *syndecan-4* nach einer Infektion mit *H. pylori* in Abhängigkeit der *cag*-PAI hochreguliert (Smith *et al.* 2006, Magalhaes *et al.* 2009). Die

Erkennung von Strukturen, die erst im entzündeten infizierten Gewebe auftreten, erleichtert die Persistenz der Bakterien. Im Fall von *H. pylori* wurde dies schon für das Adhäsin SabA beschrieben. Dieses erkennt sialysierte Lewis-Antigene, die aber erst im entzündeten Epithel vorkommen (Mahdavi *et al.* 2002). Genauso wie es der Fall für SabA ist, könnte die Adhäsion an Syndecan-4 zu der Persistenz von *H. pylori* im infizierten Gewebe beitragen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Pull-down*-Experimente mit aufgereinigter Ektodomäne von Syndecan-4 konnten jedoch keine Bindung zwischen *H. pylori* und dem Proteinanteil von Syndecan feststellen (s. Abb. 3.5). Die direkte Interaktion war denkbar, weil bekannt ist, dass der Proteinanteil neben den HS-Ketten in der Lage ist, Bindung zu anderen Molekülen zu vermitteln (Carulli *et al.* 2012). Alle bisher identifizierten Liganden von *H. pylori*-Adhäsinen sind jedoch Zuckerstrukturen und der Proteinanteil von Syndecan-4 ist im Vergleich zu den Seitenketten sehr gering, wodurch das Ergebnis erklärt werden kann. Zusätzlich ist bis heute kein Bakterium bekannt, das mit dem Proteinanteil der Syndecane interagiert. Mehrere Studien deuten auf eine Bindung zwischen *H. pylori* bzw. dessen sekretierten Faktoren und HS hin (Ascencio *et al.* 1993, Guzman-Murillo *et al.* 2001, Ruiz-Bustos *et al.* 2001). Dabei herrscht jedoch keine Einigkeit darüber, ob es sich bei *H. pylori* um ein membranständiges oder sekretiertes HS-bindendes Protein handelt. Außerdem wurden die Daten bisher von keiner unabhängigen Arbeitsgruppe bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das HS-Bindeprotein, das auch an die Seitenketten der Syndecane binden kann, einen Einfluss auf die Translokation von CagA in AGS-Zellen hat.

Für *Y. enterocolitica* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch hinzugefügtes Heparin, das von HS-Bindeproteinen erkannt wird, die Adhäsion an Zellen verringert wird (Boyd *et al.* 1998). Das hatte ebenfalls zur Folge, dass die Translokation von Effektorproteinen reduziert war (Boyd *et al.* 1998). Für *H. pylori* konnte hier hingegen durch Zugabe von Heparin die CagA-Translokation in AGS-Zellen nicht vermindert werden (s. Abb. 3.2). Die zusätzliche Entfernung von HopQ, das die CagA-Translokation beeinflusst (Ertl 2012, Belogolova *et al.* 2013), führte zwar zu dem beschriebenen reduzierten CagA-Transfer, aber auch in diesen Experimenten war die Translokation in Anwesenheit von Heparin nicht zusätzlich verringert bzw. vollständig eliminiert. Die CagA-Translokation scheint somit unabhängig von einer Bindung an Heparin und dadurch auch an HS-Ketten von Syndecan-4 zu sein. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob *H. pylori* an HS binden kann oder nicht.

Die bisher identifizierten Liganden der Adhäsine befinden sich alle auf der apikalen Seite des Epithels. Syndecane hingegen sind, wie Integrine auch, auf der basolateralen Seite des Gewebes lokalisiert (Wang *et al.* 1998, Tkachenko und Simons 2002). Eine Bindung von *H. pylori* an die HS-Ketten der Syndecane würde bei der initialen Adhäsion kaum eine Rolle spielen, da die Rezeptoren nicht zugänglich wären.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das potenzielle Adhäsin SabB bzw. HS-bindende Proteine für die Translokation von CagA nicht bedeutend sind.



## 4.2 Einfluss der HopQ-CEACAM-Interaktion auf die Translokation von CagA

Die Translokation von Effektormolekülen in Wirtszellen ist ein wichtiger Bestandteil der Pathogenität von Bakterien. Für die Sekretion bzw. Injektion von Effektoren haben Bakterien verschiedene Sekretionssysteme entwickelt, die in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

Die Bakterien der *Yersinia*-Spezies übertragen ihre Moleküle beispielsweise über ein Typ-III-Sekretionssystem (Mikula *et al.* 2012). Andere Bakterien benutzen Typ-IV-Sekretionssysteme (T4SS) zum Transport von Molekülen. Neben der Translokation von Effektoren gibt es auch T4SS, die bakterielle Konjugation vermitteln oder für die Sekretion bzw. Aufnahme von DNA verantwortlich sind (Cascales und Christie 2003). *H. pylori* aber auch *Legionella pneumophila*, *Bartonella spp.*, *Brucella spp.* und *Bordetella pertussis* besitzen T4SS, mit denen Effektoren transloziert werden. Für die Sekretionssysteme von *B. pertussis* und *H. pylori* ist nur ein transportiertes Effektorprotein bekannt. Das T4SS von *B. pertussis* ist jedoch eine Ausnahme, denn es transloziert das Pertussistoxin nicht in die Wirtszelle hinein, sondern sekretiert dieses nur ins extrazelluläre Milieu (Shrivastava und Miller 2009). *H. pylori* dagegen transloziert mit Hilfe des Cag-T4SS das Cytotoxin CagA in die Wirtszelle hinein. Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. pneumophila* nutzt das Dot/Icm-T4SS unter anderem für die Translokation von verschiedenen Effektoren in das Phagosom, aber auch zur Übertragung von genetischem Material (Cascales und Christie 2003).

Die vielfältigen Sekretionssysteme werden häufig durch andere Faktoren unterstützt. Beispielsweise wird die Translokation der Yop-Proteine durch das T3SS von *Yersinia* positiv durch die Adhäsine Ail und den trimeren Autotransporter YadA beeinflusst (Mikula *et al.* 2012). Die Translokation von CagA wird durch das äußere Membranprotein HopQ beeinträchtigt. Bei Entfernung des Proteins ist die Translokation von CagA verringert bzw. in bestimmten *H. pylori*-Stämmen sogar vollständig abwesend (Ertl 2012, Belogolova *et al.* 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Translokation von CagA in AGS-Zellen reduziert ist, wenn die Zellen zuvor mit einem HopQ-positiven Stamm infiziert wurden, aber nicht, wenn der Stamm kein HopQ produzierte (Jimenez-Soto *et al.* 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass HopQ das Cag-T4SS positiv beeinflussen kann. Bisher ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt, wie HopQ in der Lage ist das Cag-T4SS bzw. die Translokation von CagA zu beeinträchtigen, was in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

In hier durchgeführten Bindungsexperimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass *H. pylori* HopQ-abhängig an membranständiges CEA, CEACAM1, 3 und 6 adhärieren kann (s. 3.3.7). Da HopQ sich zudem in der putativen Adhäsinfamilie der äußeren Membranproteine von *H. pylori* befindet (s. 1.6), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein klassisches Adhäs in handelt. Neben HopQ beeinflusst BabA den Cag-T4SS-Apparat. BabA bindet an das fucosylierte Blutgruppenantigen Lewis<sup>b</sup>. Diese

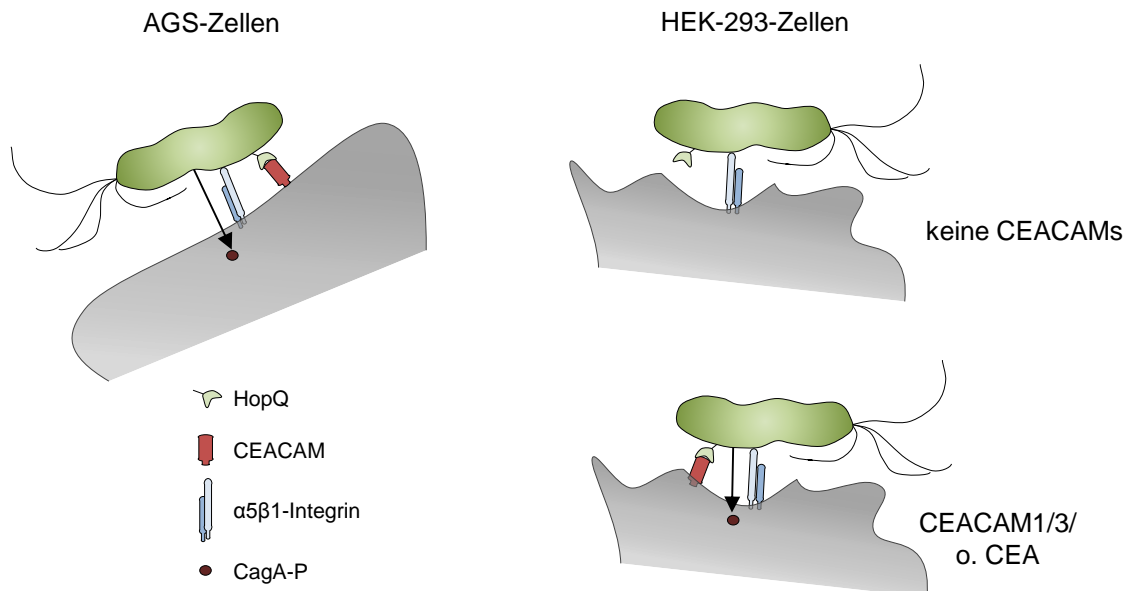
Adhäsion-Liganden-Bindung verstärkt die *cag*-PAI-abhängige Ausschüttung der proinflammatorischen Cytokine CCL5 (*chemokine (C-C motif) ligand 5*) und IL-8 (Ishijima *et al.* 2011).

Zusätzlich zu den Adhäsinen tragen auch zelluläre Rezeptoren zur erfolgreichen Translokation von CagA bei. Das Cag-T4SS benötigt  $\beta 1$ -Integrin als Rezeptor für die Translokation (Kwok *et al.* 2007, Jimenez-Soto *et al.* 2009). Dabei bindet nicht nur das Effektorprotein CagA an diesen Rezeptor sondern auch die Apparatsproteine CagY und CagI (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Widersprüchliche Daten gibt es bezüglich CagL. Es besitzt ein RGD-Motiv, das auch auf dem natürlichen Ligand Fibronectin von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin zu finden ist. Die Arbeitsgruppe um Kwok *et al.* (2007) zeigte eine RGD-abhängige Bindung an  $\beta 1$ -Integrin, die aber in der Arbeit von Jimenez-Soto *et al.* (2009) nicht bestätigt werden konnte. Für eine erfolgreiche Translokation von CagA scheint aber nicht alleine die Bindung an  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin auszureichen, sondern auch der Zustand des Integrins ist dabei relevant. Eine Aktivierung des Integrins durch Manganionen zieht eine gesteigerte CagA-Translokation nach sich (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Dagegen wird die CagA-Translokation inhibiert, wenn das Integrin durch Antikörper im aktiven Zustand stabilisiert wird (s. 1.2.1) (Jimenez-Soto *et al.* 2009). Der genaue zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht geklärt und wurde in dieser Arbeit näher beleuchtet.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen HopQ und CEACAMs einen Einfluss auf die Translokation von CagA hat. HEK-293-Zellen besitzen keine CEACAMs auf der Oberfläche und *H. pylori* kann in diese Zellen kein CagA injizieren, obwohl  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin vorhanden ist (s. Abb. 4.1). Erst nach Transfektion und erfolgreicher Produktion von CEA, CEACAM1, 3 und 6 kommt es zu einer HopQ-abhängigen CagA-Translokation (s. 3.3.2.3, 3.3.6 und 3.3.7.). In allen Fällen korreliert die HopQ-abhängige Adhäsion von *H. pylori* an CEACAMs auf der Oberfläche von HEK-293-Zellen mit der Translokation (s. Abb. 4.1). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die ermöglichte CagA-Translokation allein durch die verbesserte Adhäsion an diese Zellen hervorgerufen wird. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Adhäsion Signale ausgelöst werden, welche die CagA-Translokation zusätzlich beeinflussen.

Da CEA in der Lage ist  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin zu aktivieren, stellte sich somit die Frage, ob die Interaktion zwischen HopQ und CEA einen Einfluss auf  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin hat und folglich auch auf die Translokation von CagA (Camacho-Leal *et al.* 2007, Ordonez *et al.* 2007). Zunächst wurde untersucht, ob  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin direkt an CEA bzw. CEACAM1 binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand eine gesteigerte Affinität zu HEK-293-Zellen hat, wenn CEACAM1 bzw. CEA auf der Oberfläche vorhanden sind. Diese Beobachtung lässt aber keinen Rückschluss auf eine direkte Interaktion zwischen CEACAM1 bzw. CEA und  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin zu. Denn die erhöhte Bindung kann auch durch sekundäre Effekte entstehen, da  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin auch an die extrazelluläre Matrix (EZM) binden kann. Dafür spricht, dass sowohl CEACAM1 als auch CEA Einfluss auf die Zell-Matrix-Interaktion haben

(Muenzner *et al.* 2005, Muller *et al.* 2005, Ordonez *et al.* 2007), wodurch die gesteigerte Bindung des löslichen  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrins hervorgerufen werden könnte.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung der CagA-Translokation in verschiedenen Zelllinien.**

AGS-Zellen produzieren im Gegensatz zu HEK-293-Zellen CEACAM1, 6 und CEA auf ihrer Oberfläche. Nur wenn CEACAM1, 3, 6 oder CEA auf den HEK-293-Zellen vorhanden sind, ist *H. pylori* in der Lage CagA zu translozieren, das in der Zelle phosphoryliert (CagA-P) wird und so nachgewiesen werden kann. In HEK-293-Zellen reicht das  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin als Rezeptor des Cag-T4SS nicht aus, um CagA zu translozieren.

Die direkte Bindung zwischen CEA bzw. CEACAM1 und  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin könnte jedoch die CagA-Translokation, aber auch die Inhibition der Anoikis (Camacho-Leal und Stanners 2008), das heißt den programmierten Zelltod nach Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes, erklären. Dem gegenüber steht aber die zelluläre Lokalisierung der epithelialen CEACAMs und der Integrine. CEACAMs befinden sich auf der apikalen Seite und lateral in Zell-Zell-Verbindungen von Epithelzellen. Integrine dagegen sind auf der basolateralen Seite von Epithelzellen lokalisiert, wo sie den Kontakt zur Matrix herstellen. Ein direktes Zusammenspiel wäre nur beim Polaritätsverlust der Zellen möglich, was bei einer Infektion mit *H. pylori* der Fall ist. Eine potenzielle direkte Interaktion zwischen Integrin und CEACAMs im gesunden Gewebe ist aber eher fraglich.

#### 4.3 Die Bedeutung der Glykosylierungen und der IgC-Domänen von CEA

Die Zelladhäsionsmoleküle der CEACAM-Familie sind stark glykosylierte Proteine (Beauchemin *et al.* 1987, Zimmermann *et al.* 1987), die zu der Superfamilie der Immunglobulin-Zelladhäsionsrezeptoren gehören. Alle CEACAMs besitzen eine IgV-

ähnliche Domäne, die sich zwischen den verschiedenen CEACAMs unterscheidet. Zusätzlich kommen null (CEACAM3 und CEACAM4) bis sechs (CEA) konstante, IgC-ähnliche Domänen vor. Diese sind alle IgC2-ähnliche Domänen, die aufgrund ihrer Größe und Aminosäuresequenz in A- bzw. B-Domänen eingeteilt werden (s. 1.2.3) (Kuespert *et al.* 2006, Tchoupa *et al.* 2014).

#### 4.3.1 Funktion der Glykosylierungen von CEACAMs und deren Rolle für die Adhäsion von Bakterien

Glykosylierungen von Proteinen haben vielfältige Funktionen. Zum einen können sie zu der richtigen Faltung von Proteinen beitragen, die Löslichkeit in wässriger Lösung verbessern und Proteine vor Degradation schützen. Des Weiteren spielen sie bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen eine entscheidende Rolle. Außerdem können sie auch die Lokalisierung der Proteine in polarisierten Zellen bestimmen (Potter *et al.* 2006). Sowohl die IgV-ähnliche als auch die IgC-ähnlichen Domänen besitzen Glykosylierungsstellen, wobei sie sich in ihrer Anzahl unterscheiden (Kuespert *et al.* 2006, Zimmermann 2011, Tchoupa *et al.* 2014).

Anfang der 90er Jahre konnten Mannosestrukturen auf CEACAM1 als Rezeptoren für *E. coli* identifiziert werden (Leusch *et al.* 1991). Die Bindung von *E. coli* an CEACAM1 konnte durch aufgereinigte Typ-I-Fimbrien sowie  $\alpha$ -glykosidischer Mannose inhibiert werden (Leusch *et al.* 1991). Deshalb geht man davon aus, dass *E. coli* mit den Typ-I-Fimbrien die Zuckerstrukturen von CEACAM1 erkennt. Später konnte gezeigt werden, dass spezifisch die Glykosylierungen der IgV-ähnlichen Domäne erkannt werden (Sauter *et al.* 1993).

Die Glykosylierungen von CEACAMs scheinen jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die natürliche Funktion der Zelladhäsion zu haben. Die heterophile Bindung zwischen den IgV-Domänen von CEACAM6 und CEACAM8 ist unabhängig von der Glykosylierung (Yamanka *et al.* 1996). Außerdem ist nicht glykosyliertes CEA ebenfalls in der Lage, Zelladhäsion durch homotypische Bindung hervorzurufen (Charbonneau und Stanners 1999). Die Glykosylierungen scheinen eher die Stärke der Interaktion zu modulieren. So zeigten CEA-Moleküle mit stark reduzierten Zuckerstrukturen eine schnellere homophile Bindung als die Moleküle mit den natürlichen Zuckerstrukturen (Charbonneau und Stanners 1999). Ein Intermediat der Glykosylstrukturen auf CEA führte hingegen im Vergleich zur Kontrolle zu einer schlechteren und langsameren Bindung (Charbonneau und Stanners 1999). Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung nicht von den Zuckerstrukturen abhängig ist, diese aber von ihnen modifiziert werden kann.

Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an CEACAMs ist meist unabhängig von deren Glykosylierungen. Neisserien erkennen auch unglykosylierte CEACAMs, denn die Opa-Adhäsine interagieren mit dem Proteinanteil der IgV-ähnlichen Domäne (Bos *et al.* 1998). Ebenso ist die Bindung des DraE-Adhäsins an CEA unabhängig von Zuckerstrukturen (Korotkova *et al.* 2008a). Eine Interaktion mit CEACAMs kann also

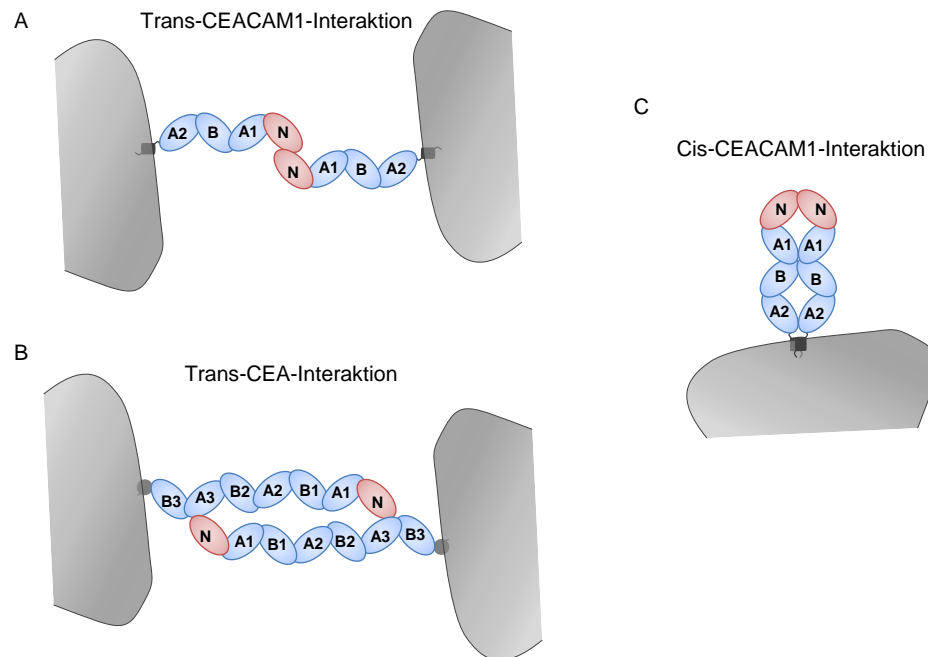
direkt durch die Bindung an den Proteinanteil der IgV-Domäne erfolgen, aber auch durch Erkennung der Glykosylstrukturen. Die bisher identifizierten *H. pylori*-Adhäsinen erkennen alle Zuckerstrukturen. BabA bindet an das fucosylierte Blutgruppenantigen Lewis<sup>b</sup>, SabA erkennt sialysierte Lewis<sup>x</sup>- und Lewis<sup>a</sup>-Antigene und erst kürzlich konnte die Zuckerstruktur GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (LacdiNAc) als Rezeptor von HopD (LabA) identifiziert werden (Boren *et al.* 1993, Ilver *et al.* 1998, Mahdavi *et al.* 2002, Rossez *et al.* 2014). Des Weiteren besitzen CEACAMs auch die mit Selektinen interagierenden Lewis<sup>x</sup>- und sialysierte Lewis<sup>x</sup>-Antigene auf ihrer Oberfläche (Kuijpers *et al.* 1992, Lucka *et al.* 2005). Diese könnten potenzielle Bindungspartner für *H. pylori* sein.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse geben jedoch keinen Aufschluss, ob HopQ mit dem Proteinanteil der CEACAMs interagiert, oder ob es die Zuckerstrukturen erkennt. Dennoch kann durch die *Pull-down*-Experimente mit löslicher IgV-Domäne demonstriert werden, dass *H. pylori* HopQ-abhängig an die IgV-Domäne von CEA und CEACAM1 bindet (s. 3.3.5 und 3.3.8) (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Zusätzlich konnte durch die in dieser Arbeit gezeigten Adhärenzexperimente mit HEK-293-Zellen eine HopQ-abhängige Adhäsion an CEACAM3 und 6 ermittelt werden (s. 3.3.6 und 3.3.7). Dadurch ist für CEACAM3 ebenfalls gezeigt, dass es an die IgV-Domäne bindet, da dieser Vertreter der CEACAM-Familie keine IgC-Domänen besitzt (s. Abb. 1.3: Übersicht über die CEACAM-Familie.). Für CEACAM6 ist nicht vollständig geklärt, ob HopQ an die IgV- oder die IgC-Domäne bindet. Dennoch ist anzunehmen, dass auch hier die IgV-ähnliche Domäne wie bei CEA, CEACAM1 bzw. 3 erkannt wird. In allen Bindungsexperimenten liegen die CEACAMs glykosyliert vor und geben aus diesem Grund keinen Aufschluss darüber, ob Zucker oder Protein erkannt wird. Erst durch isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) mit nicht glykosylierter heterolog hergestellter IgV-Domäne von CEA und HopQ konnte eine direkte Proteininteraktion demonstriert werden (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Interaktion zwischen HopQ und der IgV-Domäne von CEA ist daher unabhängig von den Zuckerstrukturen. Die Ergebnisse der ITC demonstrieren zudem eine sehr hohe Affinität ( $K_d = 61$  nM) der beiden Moleküle zueinander. Aufgrund der hohen Homologie der IgV-Domänen (über 90 %) von CEA, CEACAM1, 3 und 6 ist davon auszugehen, dass die Bindung an CEACAM1, 3 und 6 ebenfalls durch direkte Protein-Protein-Interaktion vermittelt wird. Somit sind CEACAMs die ersten identifizierten Proteinrezeptoren von *H. pylori* und HopQ das dazugehörige Adhäsinn.

#### 4.3.2 Die konstanten Domänen der CEACAM-Familie

Obwohl die konstanten Domänen einen großen Teil der CEACAM-Moleküle ausmachen, ist bisher wenig über deren Funktion bekannt. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass die IgC-Domänen für die interzelluläre Interaktion durch homophile CEACAM1-Bindung nicht notwendig sind (s. Abb. 4.2, A) (Cheung *et al.* 1993, Teixeira *et al.* 1994). Die Interaktion wird durch reziproke Bindung der IgV-Domänen hergestellt (Wikstrom *et al.* 1996, Watt *et al.* 2001). Dagegen ist die durch CEA-vermittelte interzelluläre

Bindung abhängig von den IgC-Domänen A3 und B3 (Jessup *et al.* 1993, Zhou *et al.* 1993). Die Bindung scheint durch eine doppelte reziproke Interaktion der IgV-Domäne der einen Zelle mit der IgC-Domäne A3 der anderen Zelle hervorgerufen zu werden (s. Abb. 4.2, B) (Zhou *et al.* 1993).

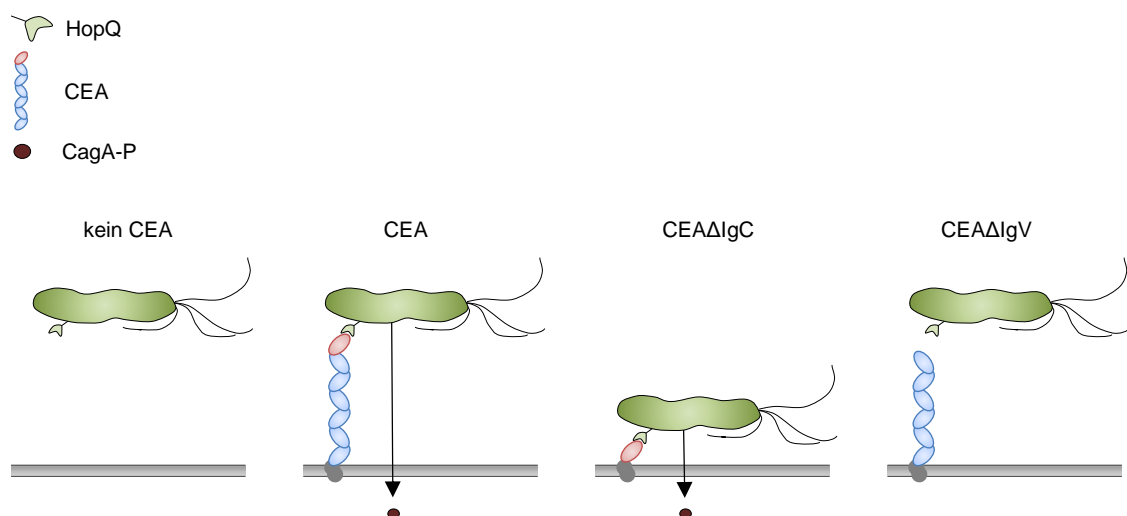


**Abb. 4.2. Modelle der Cis- und Trans-Interaktion von CEACAM1 und der Trans-Bindung von CEA.** (A) Dargestellt ist das Modell der reziproken Trans-Interaktion von CEACAM1. Die konstanten IgC-Domänen sind bei dieser Bindung nicht notwendig. (B) Doppelt reziproke Bindung zwischen CEA-Molekülen. Dabei interagiert die N-Domäne mit der A3-Domäne des gegenüberliegenden Moleküls und umgekehrt. (C) Schematische Darstellung der Cis-Adhäsion von CEACAM1-Molekülen. Die IgC-Domänen unterstützen die Interaktion zwischen den IgV-Domänen (N).

Hingegen sind alle vier Domänen von CEACAM1, die IgV- und die drei IgC-Domänen, an der parallelen Bindung beteiligt (s. Abb. 4.2, C) (Klaile *et al.* 2009). Die durch die Cis-Interaktion hervorgerufenen Mikrocluster von CEACAM-Molekülen und deren Veränderungen können zu einer Signaltransduktion führen. Ein Beispiel dafür ist die CEACAM1-vermittelte Aufnahme von Neisserien, die durch Inhibierung der Phosphatidyl-3'-Kinase (PI3K) verhindert werden kann. Die Sensitivität ist aber nur gegeben, wenn die IgC-ähnlichen Domänen von CEACAM1 vorhanden sind. Dementsprechend ist die CEA- und CEACAM6-vermittelte Endocytose auch von der Aktivität der PI3K abhängig, da beide Proteine ebenfalls IgC-Domänen besitzen (Voges *et al.* 2012). Diese Daten deuten auf einen durch Cis-Interaktion ausgelösten Internalisierungsmechanismus hin, bei dem die IgC-Domänen grundlegend beteiligt sind. Somit stellte sich die Frage, ob die IgC-Domänen auch für die Translokation von CagA notwendig sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einem um die IgC-Domänen verkürzten CEA hatten jedoch keinen Einfluss auf die CagA-Translokation

(s. Abb. 3.17). Daraus ist zu schließen, dass mittels IgC-Domänen keine Signalübertragung stattfindet, die für die Translokation wichtig ist (s. Abb. 4.3).

Eine Aktivierung von  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin durch IgC-vermittelter Rezeptorzusammenlagerung ist daher unwahrscheinlich. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei HEK-293-Zellen nicht um typische Epithelzellen handelt. Sie produzieren keine CEACAMs unter nativen Bedingungen und es handelt sich hier um eine Überexpression von CEA nach Transfektion. Somit bleibt ungeklärt, ob die Proteinzusammensetzung der HEK-293-Zellen, der des natürlichen Umfelds von CEA entspricht oder ob Korezeptoren bzw. Apatermoleküle zum Teil fehlen.



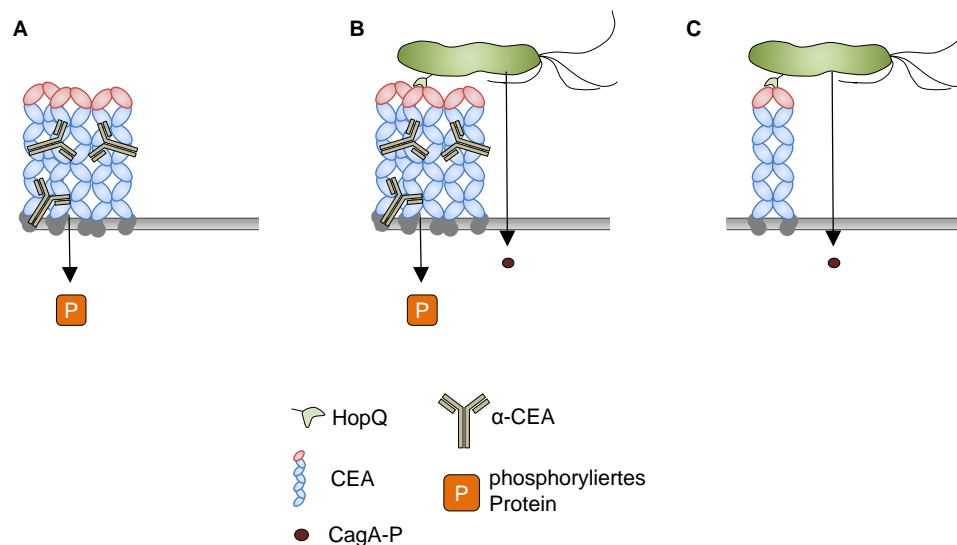
**Abb. 4.3: Einfluss der IgC- bzw. IgV-Domäne auf die Translokation von CagA.**

*H. pylori* ist nicht in der Lage CagA in HEK-293-Zellen die kein CEA bzw. CEAΔIgV besitzen, zu translozieren. Sowohl CEA als auch CEAΔIgC ermöglichen die CagA-Translokation, die durch phosphoryliertes CagA (CagA-P) nachgewiesen werden kann. Die IgC-Domänen sind nicht essenziell für die Adhäsion von *H. pylori* an die Zellen sowie für die Übertragung von CagA.

Die Zusammenlagerung von CEA kann zu einer Signalübertragung führen, obwohl es nur mittels GPI in der Membran verankert ist. Dies konnte in dieser Arbeit eindrucksvoll durch eine antikörpervermittelte Vernetzung von CEA demonstriert werden (s. Abb. 3.19). Die Vernetzung zog die Phosphorylierung eines 34 kDa großen Proteins nach sich (s. Abb. 4.4). Dieses intrazelluläre Signal wird aber nicht durch die Bindung von *H. pylori* an CEA hervorgerufen, da die Phosphorylierung des Proteins in Experimenten ohne antikörpervermittelte Vernetzung von CEA nicht detektierbar war (s. Abb. 4.4). Ebenso scheint das Signal für die CagA-Translokation nicht notwendig zu sein (s. Abb. 4.4). Des Weiteren lässt sich aus den Daten schließen, dass *H. pylori* durch HopQ-Bindung keine Vernetzung von CEA-Rezeptoren hervorruft.

Dennoch bietet die durch Zusammenlagerung hervorgerufene Phosphorylierung die Möglichkeit, die Funktion und die Signaltransduktionswege, die durch eine homophile Cis-Interaktion von CEA hervorgerufen werden, genauer zu untersuchen. Mittels Massenspektrometrie ließe sich das Protein bestimmen, wodurch Rückschlüsse auf die

Funktion bzw. den Signaltransduktionsweg gezogen werden könnten. Da CEA keine cytoplasmatische Domäne besitzt, kann das Signal zur Phosphorylierung nur durch Adaptermoleküle weitergegeben werden, die durch die Zusammenlagerung der CEA-Moleküle aktiviert werden und die Cytoplasmamembran überspannen. Generell ist die Signalübertragung von GPI-verankerten Proteinen nur durch die Zusammensetzung und Veränderungen der *Lipid-rafts* möglich, die in Abschnitt 4.4 genauer betrachtet werden (Simons und Toomre 2000).



**Abb. 4.4: Darstellung der durch antikörpervermittelten Signalübertragung von CEA.**

(A) Die Zusammenlagerung von CEA-Molekülen führt in HEK-293-Zellen zur Phosphorylierung eines unbekannten Proteins. (B) Die durch Antikörper-vermittelte Zusammenlagerung verhindert die CagA-Translokation nicht. Das unbekannte Protein wird aber zusätzlich phosphoryliert. (C) Durch die Bindung von *H. pylori* an CEA kommt es nicht zur Phosphorylierung des unbekannten Proteins.

Neben der Translokation von CagA ist die Adhärenz von *H. pylori* an membranständiges CEA ebenfalls unabhängig von den IgC-Domänen (s. Abb. 3.18). Erstaunlicherweise war sowohl die Adhäsion als auch die CagA-Translokation bei der Entfernung der IgC-Domänen höher als beim nicht verkürzten CEA (s. Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Zum einen kann dies auf die Menge des Proteins auf der Zelloberfläche zurückgeführt werden (s. Abb. 3.16). Zum anderen ist aber auch denkbar, dass durch die interzelluläre Bindung des CEA das Epitop für HopQ nicht frei zugänglich ist, da für die Trans-Interaktion von CEA die IgC-Domänen notwendig sind (s. Abb. 4.2, B). Folglich wäre CEAΔIgC nicht in der Lage, interzelluläre Verbindungen auszubilden. Dies könnte die erhöhte Adhärenz sowie die gesteigerte CagA-Translokation in HEK-293-Zellen, die CEAΔIgC produzieren, erklären. Diese Hypothese ist ebenfalls in Einklang mit den Ergebnissen aus der isothermischen Titrationskalorimetrie, die eine Stöchiometrie der Bindung von einem Molekül MBP-HopQ auf einen halben CEA-N-Dimer aufzeigte (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Eine ähnliche Stöchiometrie wurde für das DraE-Adhäsın von *E. coli* gezeigt (Korotkova *et al.* 2008a). Eine genauere Betrachtung der Bindung zwischen HopQ und der IgV-Domäne von CEA erfolgt im Abschnitt 4.5.



#### 4.4 Die durch Membranverankerung bestimmte Lokalisierung und Funktion von Proteinen

Das von Singer und Nicolson (1972) entworfene Flüssig-Mosaik-Model beschreibt die Organisation biologischer Membranen und ist bis heute gültig. Die Vorstellung, dass Membranen eine neutrale zweidimensionale Lösung sind, die keinen Einfluss auf die Bewegung der darin enthaltenen Proteine haben, ist jedoch überholt (Simons und Toomre 2000). Besonders die Membranen von eukaryotischen Zellen enthalten viele Sphingolipide und Sterole, welche die Fluidität der Membran beeinflussen (Brown und London 1998). Durch Experimente mit polarisierten Zellen entstand das Model der *Lipid-rafts*, die Gruppierung von Sphingolipiden und Cholesterol in Mikrodomänen (Simons und Toomre 2000). Diese Bereiche der Membran lassen sich im Gegensatz zu anderen nicht mit kalten Detergenzien extrahieren (Lingwood und Simons 2010). Diese Zusammenlagerung von Sterolen und Sphingolipiden hat zur Folge, dass sich nur bestimmte Proteine in diesen Bereichen der Membran befinden können. Proteine mit GPI-Anker haben eine hohe Affinität zu den Mikrodomänen ebenso wie doppelt acylierte Proteine (Simons und Toomre 2000). Eine der wichtigsten Rollen der *Lipid-rafts* ist die Weiterleitung von Signalen. Sie können als spezifische Plattformen mit individueller Rezeptorzusammenstellung betrachtet werden (Simons und Toomre 2000).

Ein GPI-Anker determiniert aber nicht nur die Lokalisierung in Mikrodomänen sondern auch die genaue Funktion des Proteins. CEA kann die Zelldifferenzierung inhibieren, das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) besitzt diese Funktion nicht, obwohl es auch mittels GPI in der Membran verankert ist. NCAM ist aber in der Lage, die Differenzierung zu blockieren, wenn der GPI-Anker gegen denjenigen von CEA ausgetauscht wird. Diese Chimäre wird im weiteren NCB genannt (Screaton *et al.* 2000). Die extrazellulären Domänen scheinen dabei dem Zusammenlagern von Molekülen zu dienen, wobei der GPI-Anker die exakte Lokalisation und somit die Funktion vorgibt. Die Entfernung der IgV-Domäne von CEA führt zum Verlust der adhäsiven Eigenschaften und der Fähigkeit, die Zelldifferenzierung zu blockieren (Eidelman *et al.* 1993). Dennoch lokalisieren die CEAΔIgV-Proteine in den gleichen Mikrodomänen wie das vollständige Protein, wogegen NCAM in anderen Mikrodomänen zu finden ist (Nicolson und Stanners 2006). Obwohl CEAΔIgV nicht in der Lage ist, die Differenzierung zu blockieren, reicht das Molekül aus, um die Aktivität von NCB (der Chimäre aus NCAM und CEA) zu inhibieren (Nicolson und Stanners 2006). Das bedeutet, dass der GPI-Anker von CEAΔIgV die Funktion des NBC vollständig unterdrückt, obwohl beide den gleichen GPI-Anker tragen (Nicolson und Stanners 2006). Dies verdeutlicht die Rolle von GPI-Verankerungen für die Funktion des Proteins inklusive verschiedener Signaltransduktionswege, die dadurch aktiviert werden können. Neben verschiedenen GPI-Ankern bestehen auch Unterschiede in der Lokalisation von Transmembranproteinen. Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Neisserien kann durch Inhibierung der Neuordnung der Aktinfilamente verhindert werden. Im Gegensatz

dazu ist die Internalisierung über CEACAM1 davon nicht betroffen (Muenzner *et al.* 2008). Zudem ist CEACAM1 im Gegensatz zu CEACAM3 nach der Bindung von Neisserien in Mikrodomänen lokalisiert. Im Einklang damit ist die CEACAM1-vermittelte Endocytose der Bakterien nach Zerstörung der *Lipid-Rafts* stark reduziert, was mit CEACAM3 als Rezeptor nicht der Fall ist (Muenzner *et al.* 2008). Die unterschiedliche Lokalisierung der beiden CEACAMs kann auf den vermeintlichen Ursprung von CEACAM3 zurückgeführt werden. CEACAM3 scheint eine Chimäre zu sein, aus der IgV-ähnlichen Domäne der CEACAMs, die von Bakterien erkannt werden (CEACAM1, 6 und CEA) einerseits und dem cytoplasmatischen Teil des auf Granulocyten vorkommenden Rezeptor CEACAM4 andererseits (Pils *et al.* 2008). Die genaue Lokalisierung der CEACAMs in der Cytoplasmamembran determiniert also den Mechanismus der Endocytose.

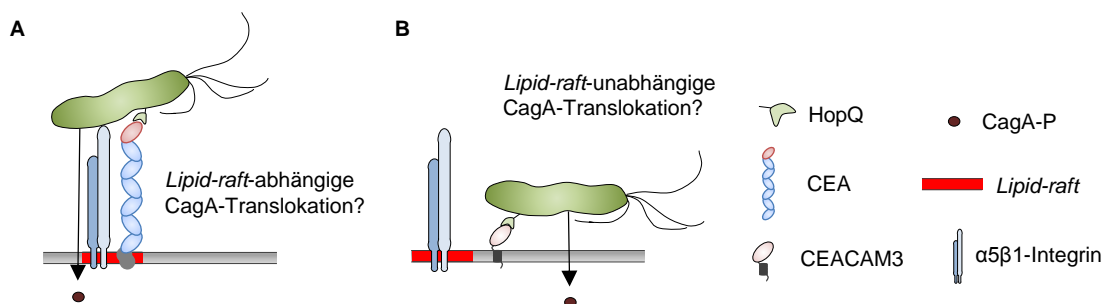
Für den Fall, dass die durch CEACAMs ermöglichte CagA-Translokation in HEK-293-Zellen nicht allein ein Resultat der gesteigerten Adhärenz der Bakterien sein sollte, sondern durch Signaltransduktion vermittelt wird, müsste sich ein solcher Mechanismus aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation zwischen CEA, CEACAM1 bzw. 6 einerseits und CEACAM3 andererseits unterscheiden. Die Lokalisierung in Mikrodomänen scheint jedoch keinen Einfluss auf die CagA-Translokation zu haben (s. 3.3.6). Das chimäre Protein aus der extrazellulären IgV-Domäne von CEA und der Transmembrandomäne von CEACAM3 führt zu einer Translokation von CagA in HEK-293-Zellen. Da der biochemische Nachweis der genauen Membranlokalisierung der Chimäre fehlt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein evtl. doch mit *Lipid-rafts* assoziiert. Eine Lokalisierung der CEA-, CEACAM1- und CEACAM6-Rezeptoren in *Lipid-rafts* würde eine physische Nähe zu den für die CagA-Translokation essenziellen  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinrezeptor bedeuten. Es würde den Zusammenhang zwischen der HopQ-CEACAM-Bindung und der Effizienz der CagA-Translokation erklären.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEACAM3 allein auch für die Translokation von CagA ausreichend ist (s. Abb. 3.25). Daher überrascht nicht, dass der Austausch des GPI-Ankers in CEA gegen die Transmembrandomäne von CEACAM3 ebenfalls die CagA-Translokation ermöglicht. Ob die CagA-Translokation im Fall von CEA, CEACAM1 bzw. 6 abhängig von *Lipid-rafts* ist und im Fall von CEACAM3 bzw. der Chimäre nicht (s. Abb. 4.5), ist dadurch jedoch noch nicht geklärt.

Um die Rolle der *Lipid-rafts* für die CagA-Translokation zu untersuchen, ist der Ankeraustausch zwischen CEA und CEACAM3 allein wenig aussagekräftig. Eine Zerstörung der *Lipid-rafts* in CEACAM3-produzierenden HEK-293-Zellen während einer Infektion könnte darüber mehr Aufschluss geben. Die CagA-Translokation sollte im Fall von CEACAM3 bzw. CEA-N/3-TM von der Zerstörung der *Lipid-rafts* unabhängig sein. Dagegen müsste die CEACAM1-, 6- bzw. CEA-vermittelte CagA-Translokation davon beeinflusst werden. In AGS-Zellen führt eine Depletion der *Lipid-rafts* zu einer verminderten CagA-Translokation (Lai *et al.* 2008). In dieser gastrischen Epithelzelllinie sind nur CEA, CEACAM1 und 6 vorhanden, die alle in der Lage sind,

mit *Lipid-rafts* zu interagieren. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass die Zerstörung der *Lipid-rafts* in diesen Zellen unter anderem zu einer Inhibierung der Signaltransduktion der CEACAMs führt, welche die Translokation von CagA beeinflusst. Ein zusätzlich eingeführter CEACAM3-Rezeptor in AGS-Zellen könnte diesen Phänotyp aufheben, wenn er ein *Lipid-raft*-unabhängiges Signal auslöst, das die Translokation ermöglicht.

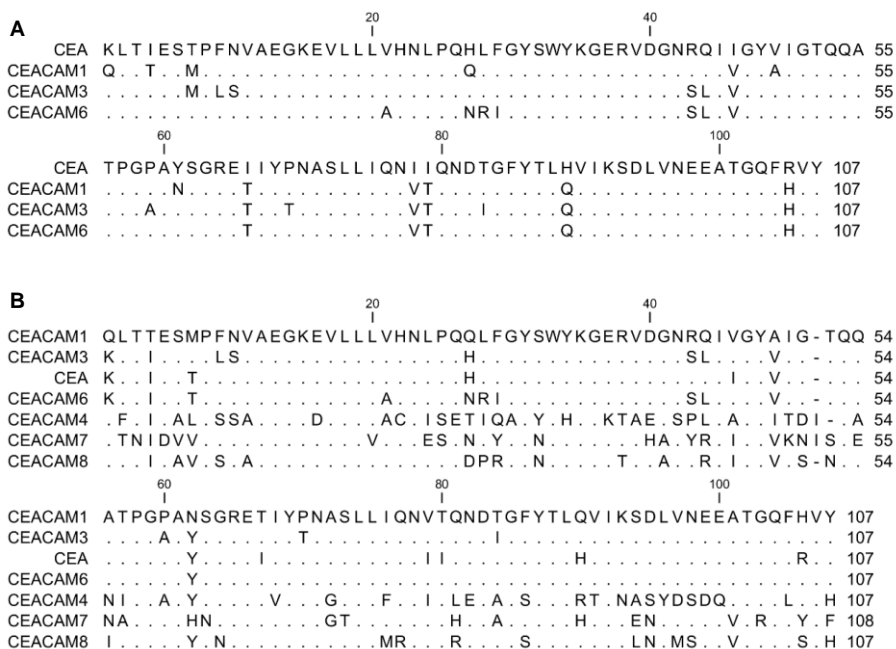
Eine weitere Möglichkeit, um zu untersuchen ob die genaue Lokalisierung von CEA einen Einfluss auf die CagA-Translokation hat, ist ein Anker austausch mit NCAM. Der Vorteil wäre hier, dass es sich ebenfalls um einen GPI-Anker handelt, der aber in anderen Mikrodomänen als CEA lokalisiert ist (Nicholson und Stanners 2006).



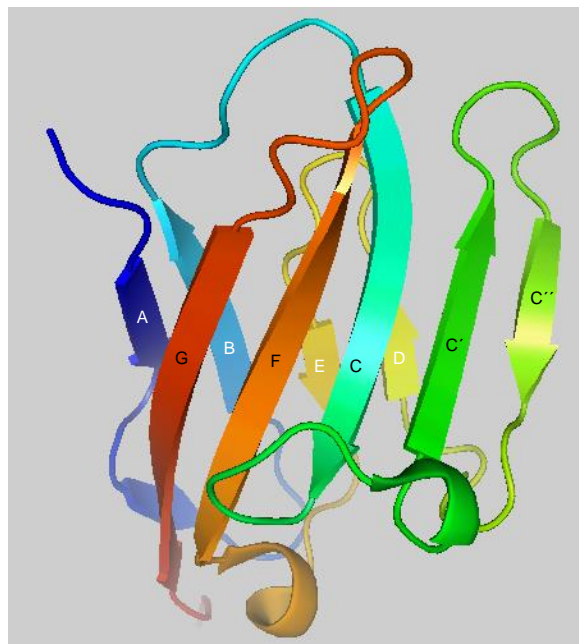
**Abb. 4.5: Modell der CagA-Translokation mit verschiedenen CEACAM-Rezeptoren.**

(A) CEA, CEACAM1 und 6 lokalisieren ebenso wie α5β1-Integrin in *Lipid-rafts*. Die Bindung an diese Rezeptoren führt zu einer CagA-Translokation (phosphoryliertes CagA, CagA-P), die potenziell abhängig von der Lokalisierung der CEACAMs ist. (B) Dagegen liegt CEACAM3 außerhalb der *Lipid-rafts*. Es ist denkbar, dass die CagA-Translokation hier von anderen Faktoren abhängig ist.

Generell muss auch hier die Frage nach der Relevanz im Gewebe gestellt werden, da sich CEACAMs apikal bzw. lateral auf den Epithelzellen befinden, Integrine dagegen basolateral. Daher sollte in zukünftigen Arbeiten der Zusammenhang zwischen der CagA-Translokation und der HopQ-CEACAM-Interaktion in polarisierten Zellen untersucht werden. Dabei gilt es den Fokus besonders auf die Frage zu legen, ob CEA auf der apikalen Seite eine Translokation von CagA ermöglicht, die unabhängig von α5β1-Integrin ist. Bis heute ist nicht geklärt, wie *H. pylori* die Zellpolarität aufhebt, da der Mechanismus von CagA abhängig ist, obwohl der für die Translokation essentielle Rezeptor α5β1-Integrin im polarisiertem Gewebe nicht zugänglich ist (Kwok *et al.* 2007, Jimenez-Soto *et al.* 2009, Tan *et al.* 2009). CEACAMs auf der apikalen Seite könnten für die initiale Translokation von CagA eine entscheidende Rolle spielen, die den Verlust der Zellpolarität nach sich zieht, wodurch α5β1-Integrin als Rezeptor für *H. pylori* erreichbar werden würde.



CEACAM-Familie bilden im Gegensatz zu den IgC-ähnlichen Domänen keine strukturstabilisierende Disulfidbrücke aus (Vaughn und Bjorkman 1996, Tchoupa *et al.* 2014). Die  $\beta$ -Faltblätter der IgV-Domäne bestehen aus den  $\beta$ -Strängen A, B, C, C', C'', D, E, F und G (s. Abb. 4.7) (Vaughn und Bjorkman 1996, Watt *et al.* 2001). Dabei bilden die Stränge ABED das eine und GFCC'C'' (auch CFG-Seite genannt) das andere  $\beta$ -Faltblatt (Vaughn und Bjorkman 1996, Watt *et al.* 2001, Korotkova *et al.* 2008a). Die CFG-Seite der IgV-ähnlichen Domäne der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) ist sehr exponiert und frei von Kohlenhydratseitenketten, was es zu einer guten Bindungsstelle für Interaktionspartner macht (s. Abb. 4.7) (Driscoll *et al.* 1991). Die Affinität der Interaktionen zwischen Mitgliedern der IgSF bzw. der homophilen Bindung ist relativ gering (Taheri *et al.* 2000). Dennoch haben die hetero- und homotypischen Interaktionen der CEACAM-Moleküle eine wichtige Bedeutung für deren Funktionen und spielen bei der Bindung von pathogenen Bakterien eine Rolle. Aus diesen Gründen wird in diesem Abschnitt der Fokus auf die für die hetero- bzw. homophile Adhäsion essenziellen Aminosäuren bzw. die strukturellen Determinanten gelegt.

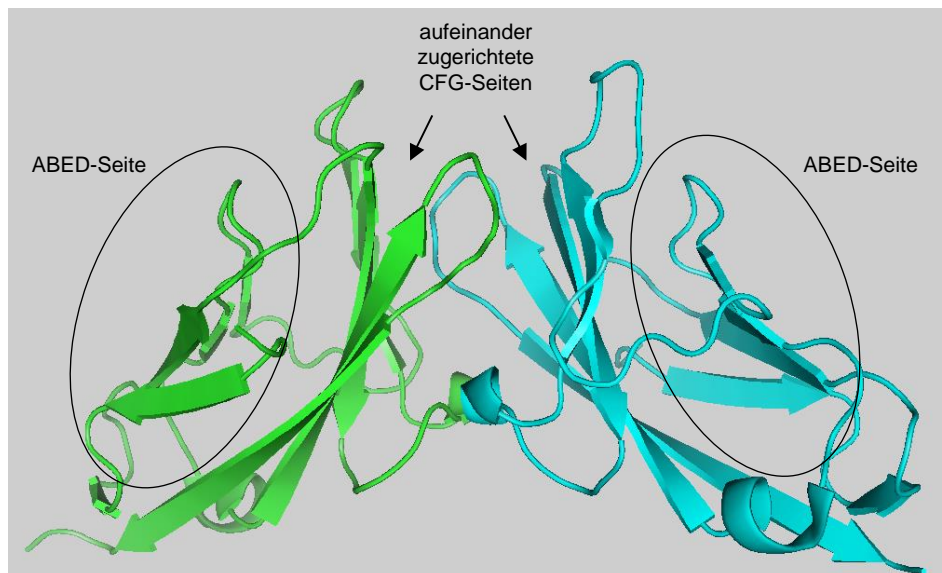


**Abb. 4.7: Dreidimensionale Struktur der IgV-Domäne von CEA**

Dargestellt ist die IgV-Domäne von CEA (protein data base: 2QSQ, (Korotkova *et al.* 2008a)) aus der Seitenansicht. Zu erkennen sind die zwei  $\beta$ -Faltblätter ABED (weiße Beschriftung) und GFCC'C'' (schwarze Beschriftung). Vor dem  $\beta$ -Strang A befindet sich der N-terminale Bereich des Proteins und der C-terminale Bereich liegt hinter dem Strang G.

Die homophile interzelluläre Bindung von CEA ist abhängig von drei kurzen Regionen, die sich alle in dem GFCC'C''-Faltblatt befinden (Taheri *et al.* 2000). Diese Regionen beinhalten die fünf Aminosäuren ab der Position 42 (<sup>42</sup>NRQII), die Aminosäuren <sup>30</sup>GYSWYK und die an Position 80 (<sup>80</sup>QNDTG) (Taheri *et al.* 2000). Letztere scheint jedoch im Vergleich zu den anderen beiden keine große Rolle zu spielen (Taheri *et al.* 2000). Da diese Bereiche für die interzelluläre homophile Adhäsion notwendig sind, ist

es wahrscheinlich, dass die CFG-Seite mit den A3B3-Domänen des CEA-Moleküls auf der benachbarten Zelle interagiert (s. Abb. 4.2, B) (Zhou *et al.* 1993). Auch für das lösliche aus zwei IgV-Domänen bestehende CEA-Dimer konnte gezeigt werden, dass die CFG-Seiten einander zugewendet sind (s. Abb. 4.8) (Korotkova *et al.* 2008a).



**Abb. 4.8: Dreidimensionale Struktur des löslichen IgV-Dimers von CEA.**

Dargestellt ist das Dimer von CEA aus der Seitenansicht (*protein data base*: 2QSQ, (Korotkova *et al.* 2008a)), bestehen aus zwei IgV-Domänen (grün und blau). Die ABED-Seiten liegen außerhalb und die CFG-Seiten sind einander zugewendet.

Die Aminosäuren an den Positionen R43 und Q44, die sich ebenfalls in der CFG-Seite befinden, sind unter anderem für die heterophile Interaktion zwischen CEACAM1 und CEA relevant (Markel *et al.* 2004). Die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren wird in dem Abschnitt 4.5.3 genauer beschrieben.

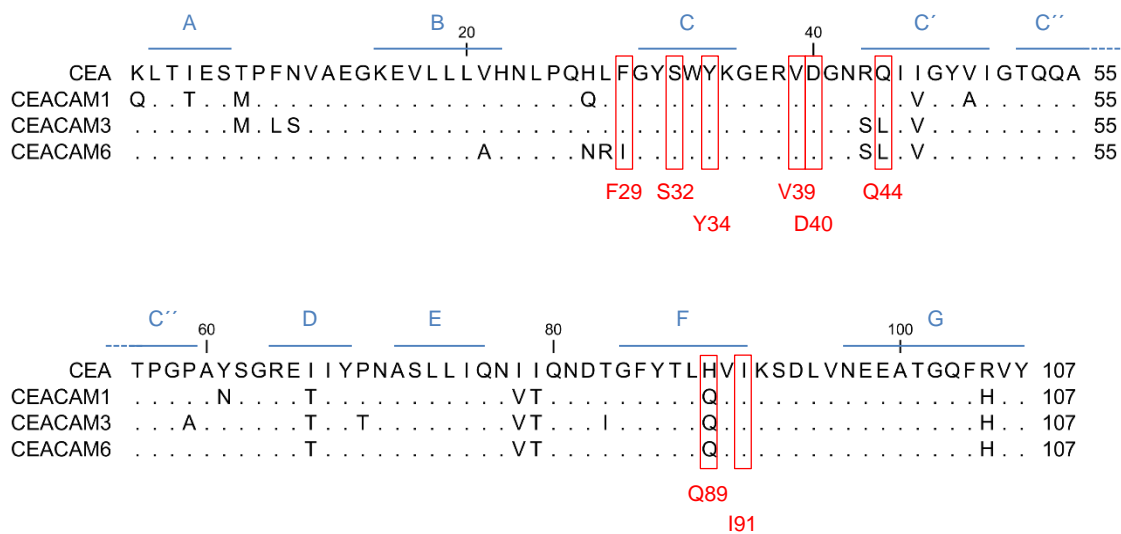
Für CEACAM1 konnte gezeigt werden, dass die CC'-Stränge entscheidenden Einfluss auf die homophile Adhäsion haben (Watt *et al.* 2001). Ein Austausch der Aminosäure V39 bzw. D40 zu Alanin unterbindet die Interaktion (Watt *et al.* 2001). Beide Aminosäuren befinden sich zwischen den  $\beta$ -Strängen C und C'. Ebenso wichtig für die Interaktion scheint die Salzbrücke zwischen dem D- und F-Strang zu sein, die von den Aminosäuren R64 und D82 hergestellt wird (Watt *et al.* 2001). Es ist jedoch nicht geklärt, ob die Salzbrücke für die interzelluläre Adhäsion oder für die Integrität des Proteins wichtig ist, wobei letzteres aufgrund der Lokalisation der Salzbrücke wahrscheinlicher ist (Taheri *et al.* 2000). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die CFG-Seite maßgeblich an der Adhäsion beteiligt ist und somit auch zu der Funktion der CEACAMs beiträgt.

#### 4.5.2 Einblicke in die strukturellen Aspekte der bakteriellen Bindung an die IgV-Domäne von CEACAMs

Neisserien können bis zu zwölf unterschiedliche Opa-Proteine produzieren, die in HS- bzw. CEACAM-bindende (Opa<sub>CEA</sub>) Proteine unterteilt werden (Hauck und Meyer 2003). Die Adhäsine der Opa<sub>CEA</sub>-Familie können entweder alle vier bakteriellen CEACAM-Rezeptoren (CEACAM1, 3, 6 und CEA) erkennen oder spezifisch nur an CEACAM1 und CEA binden (Bos *et al.* 1997, Gray-Owen *et al.* 1997). Vorhersagen der Sekundärstruktur der Opa-Proteine deuten auf acht antiparallele  $\beta$ -Stränge hin, die in der äußeren Membran eine  $\beta$ -Fassstruktur ausbilden und vier extrazelluläre Schleifen besitzen (Malorny *et al.* 1998). Die inneren Schleifen besitzen zwei hypervariable Bereiche (HV-1 und HV-2), die für die Adhäsion an die Rezeptoren verantwortlich sind (Grant *et al.* 1999, Bos *et al.* 2002). Das CEACAM-bindende P5-Adhäsine von *H. influenzae* bildet ebenfalls eine  $\beta$ -Fassstruktur mit extrazellulären Schleifen aus (Webb und Cripps 1998).

Die Opa-Adhäsine binden an die CFG-Seite der IgV-Domäne der CEACAMs (s. Abb. 4.7 und Abb. 4.9) (Bos *et al.* 1999, Popp *et al.* 1999, Virji *et al.* 1999). Die CEACAM1-Bindung ist von den in der CFG-Seite vorkommenden Aminosäuren der Positionen 34 (Tyrosin) und 91 (Isoleucin) abhängig (Virji *et al.* 1999). Diese Aminosäuren sind jedoch sehr konserviert und kommen auch in CEACAM4, 7 und 8 vor. Dies sind alles CEACAMs, die nicht von Opa-Proteinen erkannt werden (s. Abb. 4.6, B). Die spezifische Erkennung der IgV-Domäne durch Opa-Proteine muss also von weiteren Aminosäuren unterstützt werden. Tauscht man beispielsweise das Serin an der Position 32, das in der Nähe der kritischen Aminosäuren lokalisiert ist, mit einem Alanin oder Asparagin aus, kommt es zur Inhibierung der Bindung einiger Opa-Proteine (s. Abb. 4.9) (Bos *et al.* 1999, Popp *et al.* 1999, Virji *et al.* 1999). Die Bindung von einigen Opa-Proteinen an CEACAM1 kann auch durch den Austausch von V39, Q44 oder Q89 zu Alanin verhindert werden (Virji *et al.* 1999).

Bei typisierbaren *H. influenzae* (bekapselte Stämme) führen Alanine an den Positionen 44, 34, 91 von CEACAM1 ebenfalls zu einem Verlust der Bindung (s. Abb. 4.9). Dagegen erkennen nichttypisierbare *H. influenzae*-Stämme CEACAM1 auch dann, wenn an der Position 44 ein Alanin statt des Glutamins vorhanden ist, aber nicht, wenn sich an Position 89 ein Alanin befindet (Virji *et al.* 2000). Einzig der Austausch des Isoleucins zu Alanin an der Position 91 führte bei allen *H. influenzae*-Stämmen dazu, dass die IgV-Domäne von CEACAM1 nicht mehr erkannt wird (s. Abb. 4.9) (Virji *et al.* 2000).



**Abb. 4.9: Aminosäuresequenzen von CEACAM1, 3, 6 und CEA und die Lokalisierung der  $\beta$ -Stränge.** Die Aminosäuren, welche die  $\beta$ -Stränge ausbilden, sind mit blauen Strichen gekennzeichnet. In rot sind die Aminosäuren hervorgehoben, die eine Rolle für die Erkennung durch bakterielle Adhäsine spielen.

Für die Erkennung der IgV-Domäne von CEA durch Dr-Adhäsine von *E. coli* scheint ebenfalls die CFG-Seite entscheidend zu sein (Korotkova *et al.* 2006). Die Mutagenese, die zum Austausch der Aminosäuren an den Positionen 29, 40 und 44 zu denjenigen führt, die an der entsprechenden Stelle bei CEACAM8 sind, hat zur Folge, dass CEA nicht mehr erkannt wird (Korotkova *et al.* 2006). Die zum Teil für die Opa-Bindung wichtigen Aminosäuren an den Positionen 32 und 39 haben bei einem Austausch gegen Asparagin bzw. Alanin keinen Einfluss auf die DraE-CEA-Bindung (Korotkova *et al.* 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DraE in der Lage ist, lösliche CEA-Dimere (s. Abb. 4.8) aufzuspalten, um an diese zu binden (Korotkova *et al.* 2008a). Der Austausch des Valins an der Position 39 gegen Cystein hat zur Folge, dass sich eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei IgV-Domänen ausbildet, die zu einem stabilen Dimer führt (Korotkova *et al.* 2008a). Das Adhäsine DraE ist nicht in der Lage, an den stabilen V39C-Dimer von CEA zu binden, obwohl dieser strukturell sehr ähnlich zum nativen Dimer ist (Korotkova *et al.* 2008a).

Der in dieser Arbeit durchgeführte Austausch von Valin gegen Cystein an der Position 39 in membranständigem CEA hatte weder Einfluss auf die Adhäsion von *H. pylori* an diese Zellen noch auf die Translokation von CagA (s. Abb. 3.20). Der gleiche Austausch in membranständigem CEA $\Delta$ IgC hingegen führte zu einer leicht verringerten Adhäsion von *H. pylori* (s. Abb. 3.21). Es wurde jedoch nicht überprüft, ob die Aminosäureaustausche zu einer stabilen Dimerisierung der CEA-Moleküle auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen führten. Für lösliches CEA-N-GFP konnte gezeigt werden, dass die Bindung durch den Austausch um ca. 24 % reduziert wurde (s. Abb. 3.22). Die Überprüfung des Dimers ergab, dass nur ca. 13 % des CEA-N-GFPs als Dimer vorliegen. Die Reduktion der Bindung kann dadurch nicht eindeutig auf eine kovalente Dimerisierung zurückgeführt werden. Die Frage ob *H. pylori* durch die Bindung an CEA



zu einer Rezeptordissoziation führt bleibt somit offen. Des Weiteren ist es auch möglich, dass das Valin an der Position 39 für die Erkennung des CEA durch HopQ notwendig ist, so wie es bei einigen Opa-Proteinen der Fall ist (Virji *et al.* 1999). Zur weiteren Überprüfung könnte das Valin an Position 39 gegen ein Alanin ausgetauscht werden. Dadurch würde es nicht zur Ausbildung eines kovalenten Dimers kommen, womit eine Aussage über die Relevanz des Valins für die Erkennung durch HopQ getroffen werden könnte.

Die CFG-Seite bietet sich auch für *H. pylori* als Bindedomäne an. Zum einen ist dieser Bereich exponiert und besitzt keine Glykosylierungen, die eine direkte Protein-Protein-Interaktion behindern könnten. Zum anderen hat die Erkennung von Strukturen, die für die natürlichen Funktionen der CEACAMs notwendig sind einen Vorteil; Die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, dass es in diesen konservierten, für die Funktion essenziellen Bereichen, zu Mutationen kommt. Da die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse generell keinen Aufschluss über die genaue IgV-Bindungsstelle von HopQ geben, kann zunächst in einem einfachen Experiment geprüft werden, ob die CFG-Seite für die Bindung zuständig ist. Für die Analyse kann der Antikörper YTH71.3 verwendet werden. Dieser erkennt die CFG-Seite von CEACAM1, 3 bzw. 6 und kann die Bindung von *H. influenzae* bzw. Neisserien an CEACAMs inhibieren (Virji *et al.* 1999, Virji *et al.* 2000).

Das Austauschen von einzelnen Aminosäuren in der CFG-Seite von CEACAMs kann einen Einfluss auf die homo- bzw. heterotypische Adhäsion der Moleküle haben, da diese wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben auch durch die CFG-Seite vermittelt werden. Bei solchen Mutationen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dadurch verursachten Veränderungen in der Oligomerisierung der CEACAM-Moleküle, nicht auch die Adhäsion von Bakterien beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *H. pylori* HopQ-abhängig an membranständiges CEACAM1, 3, 6 und CEA binden kann. Dagegen konnte eine HopQ-abhängige Bindung in *Pull-down*-Experimenten mit löslichen CEACAM-N-GFP-Proteinen nur für CEACAM1 und CEA demonstriert werden (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Die Diskrepanz zwischen den Bindungsexperimenten kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist in dem Experiment mit den löslichen Rezeptoren nur dessen IgV-Domäne vorhanden, wogegen die membranständigen CEACAMs mit IgC-Domänen vorliegen, wenn sie welche besitzen. Auch wenn HopQ an die IgV-Domäne von CEA und CEACAM1 bindet, kann es sein, dass für die Erkennung von CEACAM6 die IgC-Domänen notwendig sind. Ein Hinweis dafür könnte sein, dass die Anzahl der IgC-Domänen des murinen CEACAM1 die Bindung des Maus-Hepatitis-Virus beeinflusst, obwohl das Adhäsins gegen die IgV-Domäne gerichtet ist (Wessner *et al.* 1998). Dieser Ansatz kann zwar für den CEACAM6 Rezeptor stimmen, bietet aber keinen Erklärungsansatz, warum *H. pylori* CEACAM3 nur membranständig erkennt, da dieser Rezeptor auch hier keine IgC-Domänen besitzt. Zum anderen kann die Dimerisierung der Rezeptoren eine Rolle spielen. Die Affinität der Bindung zwischen

CEACAMs ist erstaunlicherweise sehr gering (van der Merwe und Barclay 1994). Cis-Interaktion von CEACAMs können aber zusätzlich durch die IgC-Domänen unterstützt werden (s. Abb. 4.2, C) (Klaile *et al.* 2009). Die IgC-Domänen fehlen jedoch bei den *Pull-down*-Experimenten mit löslichen CEACAM-N-GFP-Proteinen, wodurch die Dimerisierung beeinflusst sein kann. Es ist denkbar, dass die IgV-Domänen von CEA bzw. CEACAM1 in Lösung eher Dimere ausbilden als CEACAM3 bzw. 6. Diese Theorie wird von der Beobachtung unterstützt, dass die lösliche IgV-Domäne von CEA im Gegensatz zu der von CEACAM6 als Dimer vorliegt (Krop-Watorek *et al.* 1998, Korotkova *et al.* 2008a). Außerdem konnte gezeigt werden, dass LFA-1 (Leukocyten Funktions-Antigen-1) nur in der Lage ist, an dimerisiertes ICAM (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) zu binden, das wie CEACAMs auch ein Vertreter der Ig-Superfamilie ist. Die monomere Form die nach der rekombinanten Herstellung vorliegt wird hingegen von LFA-1 nicht erkannt (Miller *et al.* 1995, Reilly *et al.* 1995). Da aber angenommen wird, dass CEACAM3 weder homo- noch heterotypische Interaktionen eingeht, ist davon auszugehen, dass CEACAM3 auf der Zelloberfläche eine natürlichere Struktur annimmt, wodurch HopQ in der Lage ist, membranständiges CEACAM3 zu erkennen.

Außerdem scheint es einen Unterschied in den Bindungsmustern zwischen CEACAM1 bzw. CEA und CEACAM3 bzw. CEACAM6 zu geben. Opa-Proteine, die CEACAM6 erkennen, binden auch an CEACAM3 und umgekehrt, wohingegen einige Opa-proteine nur an CEA, andere aber an CEA und CEACAM1 adhärieren können (Bos *et al.* 1999, Hauck und Meyer 2003). Daraus lässt sich schließen, dass sich die Bindungseigenschaften zwischen CEACAM1 bzw. CEA und CEACAM3 bzw. 6 unterscheiden. Aufgrund dessen ist denkbar, dass die Interaktion zwischen *H. pylori* und der IgV-Domäne von CEACAM3 und 6 in dem *Pull-down*-Experiment mit löslichem Rezeptor nicht detektiert werden kann, da die Bindungseigenschaften hier anders sind. Einerseits könnte die Affinität von HopQ zu CEACAM3 bzw. 6 in Lösung geringer sein als zu CEACAM1 bzw. CEA und die Bedingungen während des *Pull-downs* zu stringent, um diese schwächere Interaktion zu detektieren. Andererseits spricht gegen diese Theorie, dass in den Experimenten mit transient transfizierten HEK-293-Zellen kein Unterschied in der Adhärenz von *H. pylori* an CEA im Vergleich zu CEACAM6 produzierenden Zellen zu erkennen war (s. Abb. 3.26).

Unterschiede in der Bindung von Adhäsinen an lösliche IgV-Domänen im Vergleich zu membranständigen Rezeptoren wurden schon in anderen Studien gezeigt. Beispielsweise demonstrierten Bos *et al.* (1999), dass membranständige CEACAMs durch Opa-Proteine besser erkannt werden als lösliche. Der Austausch der Aminosäuren R29 und N32 in CEACAM8 zu den entsprechenden von CEA (Phenylalanin und Serin) führte nur bei membranständigem, vollständigem Protein zu einer Erkennung durch OpaB, C und I. Hingegen konnte keine Bindung der Opas an die mutierte lösliche N-Domäne von CEACAM8 detektiert werden (Bos *et al.* 1999).

Über die Gründe der Diskrepanzen der Ergebnisse kann nur spekuliert werden. Ein näheres Beleuchten der molekularen Ursachen ist in dieser Arbeit jedoch durch den Aminosäureaustausch an den Positionen R43 und Q44 im CEA gelungen. Die Relevanz dieser beiden Aminosäuren für die Funktion von CEA bzw. CEACAM1 und dessen Auswirkungen auf die Bindung von HopQ wird daher im nächsten Abschnitt genauer betrachtet.

#### 4.5.3 Die Relevanz der Aminosäuren R43 und Q44 in CEA und CEACAM1

Die Aminosäuren an den Positionen R43 und Q44 spielen eine entscheidende Rolle für die heterophile Interaktion von CEA bzw. CEACAM1 (s. 4.5.1). Obwohl die IgV-Domänen von CEACAM1, 3, 6 und CEA zu 90 % identisch sind (s. Abb. 4.6, A), ist CEACAM1 nur in der Lage mit CEA oder sich selbst zu interagieren, nicht aber mit CEACAM6 (Markel *et al.* 2004). Die homotypische Interaktion von CEACAM1 wird von Valin und Asparagin an den Positionen 39 und 40 unterstützt (Watt *et al.* 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Salzbrücke zwischen den Aminosäuren R64 und D82 für die homophile Interaktion von CEACAM1 wichtig ist (Watt *et al.* 2001). Die homophile Adhäsion von CEA ist hingegen nicht so stark von der Salzbrücke zwischen den Aminosäuren R64 und D82 abhängig (Taheri *et al.* 2000). Diese Aminosäuren erklären aber nicht die Spezifität der heterotypischen Interaktion von CEACAM1, da sich CEACAM1, 3, 6 und CEA in diesen Aminosäuren nicht unterscheiden (Watt *et al.* 2001).

Zusätzlich zu diesen Aminosäuren wurden drei Regionen der IgV-Domäne von CEA identifiziert, die für die homophile Bindung entscheidend sind (Taheri *et al.* 2000) (s. 4.5.1). Zum einen ist dies der Bereich um die Aminosäuren an der Position 30 (G30YSWYK) und 80 (Q80NDTG), aber auch die fünf Aminosäuren ab der Position 42 (NRQII) (Taheri *et al.* 2000). Die einzigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den verschiedenen CEACAMs finden sich in der Region um die Position 42. Hier unterscheiden sich CEACAM1 und CEA zu CEACAM3 und 6 in den Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 (s. Abb. 4.6 und Abb. 4.9). Bei CEACAM1 und CEA befinden sich an diesen Positionen ein Arginin und ein Glutamin, wogegen CEACAM3 und 6 hier Serin und Leucin aufweisen. Diese Unterschiede führen zu der Spezifität, dass CEACAM1 mit CEA interagiert, aber nicht mit CEACAM6. Ein Austausch dieser Aminosäuren in CEA gegen diejenigen von CEACAM6 führt zum Verlust der heterophilen Interaktion mit CEACAM1 (Markel *et al.* 2004). Der entgegengesetzte Aminosäureaustausch in CEACAM6 führt dazu, dass CEACAM6 anschließend in der Lage ist mit CEACAM1 heterotypische Interaktionen auszubilden (Markel *et al.* 2004). Die Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 spielen folglich eine entscheidende Rolle für die Erkennung von nativen Bindungspartnern.

Die Aminosäure Q44 ist zudem entscheidend für die Erkennung von CEA durch das DraE-Adhäsin von *E. coli*. Ein Austausch zu Arginin hebt die Bindung von DraE an CEA auf (Korotkova *et al.* 2006). Die Substitution von Glutamin an der Position 44 zu Arginin

bzw. Leucin führt nicht nur dazu, dass DraE nicht mehr an CEA binden kann, sondern auch, dass die IgV-Domäne von CEA nicht mehr als Dimer vorliegt (Korotkova *et al.* 2008a). Die IgV-Domäne von CEACAM6, die an dieser Stelle ein Leucin besitzt, bildet in Lösung keine Dimere aus (Korotkova *et al.* 2008a).

Da *H. pylori* die lösliche IgV-Domäne von CEA, nicht aber von CEACAM6 erkennt (s. 3.3.7 und Tab. 13, Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung), könnte man aus den Ergebnissen schließen, dass die Dimerisierung der löslichen Rezeptoren für die Erkennung durch HopQ notwendig ist. Diese Theorie wird von der Tatsache unterstützt, dass *H. pylori* zwar in der Lage ist, CEA auch dann zu erkennen, wenn die Aminosäuren R43 und Q44 gegen die von CEACAM6 (Serin und Leucin) ausgetauscht sind. Die Bindung erfolgt jedoch nur dann, wenn der Rezeptor membranständig vorliegt. Das lösliche GFP-Fusionsprotein wird in diesem Fall nicht erkannt (s. 3.3.8 und Tab. 13). Es ist denkbar, dass der Rezeptor trotz des Aminosäureaustausches auf der Oberfläche von Zellen als Dimer vorliegt, obwohl in Lösung die monomere Form vorherrscht. Einerseits sind die Rezeptoren auf der Zelloberfläche in großer Anzahl vorhanden und besitzen die IgC-Domänen, was eine Dimerisierung begünstigt. Andererseits bildet auch CEACAM6 homotypische Interaktionen aus, wodurch der Rezeptor wahrscheinlich membranständig auch Dimere ausbildet (Kuroki *et al.* 2001).

**Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindung von *H. pylori* an CEACAMs.**

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen der Erkennung von löslichen CEACAM-Rezeptoren im Vergleich zu membranständigen Rezeptoren. Die CEACAM-Proteine, die nicht durch *H. pylori* erkannt werden sind rot hinterlegt. Die Daten stammen aus dieser Arbeit und aus den vorangegangenen Arbeiten von V. Königer (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

membranständige Rezeptoren	Bindung von <i>H. pylori</i>	lösliche Rezeptoren	Bindung von <i>H. pylori</i>
CEA	ja	CEA-N-GFP	ja
CEA R43S Q44L	ja		
CEAΔIgC R43S Q44L	ja	CEA R43S Q44L-N-GFP	nein
CEACAM1	ja	CEACAM1-N-GFP	ja
CEACAM3	ja	CEACAM3-N-GFP	nein
CEACAM6	ja	CEACAM6-N-GFP	nein

Gegen die Theorie, dass *H. pylori* nur einen Dimer der IgV-Domänen erkennt, spricht aber einerseits, dass CEACAM3 keine homophilen Interaktionen eingeht und dieser Rezeptor somit wahrscheinlich auch auf der Zelloberfläche nicht als Dimer vorliegt (Oikawa *et al.* 2000). Andererseits zeigten die Daten der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC), dass HopQ an den CEA-Dimer mit einer Stöchiometrie von 1:0,62 bindet (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Das deutet daraufhin, dass HopQ nicht einen Dimer erkennt, sondern die Untereinheiten einzeln. Für das DraE-

Adhäsion von *E. coli* konnte zudem gezeigt werden, dass das Protein die IgV-Domäne von CEA sowohl als Dimer als auch als Monomer erkennt (Korotkova *et al.* 2008a). Es ist daher unwahrscheinlich, dass HopQ CEACAMs nur erkennt, wenn diese als Dimer vorliegen.

Die Relevanz der Aminosäuren an den Positionen 43 und 44 für die homophile als auch für die Spezifität der heterophilen Interaktion ist durch viele Studien belegt (Virji *et al.* 1999, Virji *et al.* 2000, Markel *et al.* 2004, Korotkova *et al.* 2006). Ebenso spielen diese Aminosäuren bei der Erkennung von CEACAMs durch bakteriellen Adhäsine eine Rolle. Die Umgebung der Rezeptoren scheint die Erkennung durch Adhäsine jedoch stark zu beeinflussen. Außerdem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Aminosäuren der Positionen 43 und 44 entscheidend für die Erkennung der IgV-Domäne von CEACAMs durch HopQ sind. Des Weiteren lässt sich daraus vermuten, dass HopQ genauso wie Opa-Proteine von Neisserien und das DraE-Adhäsion von *E. coli* an die CFG-Seite des CEA bindet. Weitere Experimente, welche die Bindungsstelle von HopQ untersuchen, sind notwendig, um eine genaue Aussage über einzelne beteiligte Aminosäuren treffen zu können.

#### 4.6 Durch bakterielle Bindung an CEACAMs ausgelöste Signaltransduktionen

Die Adhäsion von Bakterien an CEACAMs kann zu einem Zusammenlagern der Rezeptoren führen, das wiederum zelluläre Antworten hervorrufen kann. Eine erfolgreiche Kolonisierung wird durch die ausgelösten Signale unterstützt (Tchoupa *et al.* 2014). Neben der reinen Adhäsion kommt es in vielen Fällen zu einer CEACAM-vermittelten Endocytose der Bakterien (Virji *et al.* 1996a, Wang *et al.* 1998). Dies ermöglicht es den Bakterien, die intakte Epithelschicht zu durchdringen. Experimente mit polarisierten Epithelzellen zeigten, dass die Opa-CEACAM-Interaktion allein für die Endocytose ausreichend ist (Wang *et al.* 1998). Opa-produzierende *N. gonorrhoeae*- bzw. *E. coli*-Stämme führten zu einer Transcytose, ohne dabei die Polarität der Epithelschicht zu zerstören (Wang *et al.* 1998).

Der Mechanismus der Aufnahme unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen Rezeptoren. Die erfolgreiche Internalisierung durch epitheliale CEACAMs (CEACAM1, 6 und CEA) ist abhängig von der Integrität der *Lipid-rafts* (Schmitter *et al.* 2007). Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme hingegen ist von der Zerstörung der *Lipid-rafts* unabhängig, benötigt aber die Funktion der Src-Kinasen-Familie (SKF) (Schmitter *et al.* 2007). Die Phosphorylierung des ITAM von CEACAM3 durch Mitglieder der SKF nach der Rezeptorbindung ist der kritische erste Schritt der CEACAM3-vermittelten Endocytose (McCaw *et al.* 2003, McCaw *et al.* 2004, Korotkova *et al.* 2008b). Die Interaktion der Kinasen mit dem ITAM erfolgt über die Src-Homologie-2-Domänen (Kiefer *et al.* 1998). Die darauffolgende Phosphorylierung löst die Aktivierung von GTP-

Austauschfaktoren (*guanosine triphosphate exchange factor*, GEF) aus, die wiederum kleine GTPasen der Rho-Familie stimulieren (Buntru *et al.* 2012, Tchoupa *et al.* 2014). Die kleine GTPase Rac und deren Effektorprotein WAVE2 führen dann zu Reorganisation des Aktincytoskeletts, wodurch Vorstülpungen der Membran entstehen und die Bakterien aufgenommen werden (Schmitter *et al.* 2004, Pils *et al.* 2012).

Da die durch CEACAM1-, 6- bzw. CEA-vermittelte Endocytose von der Integrität der *Lipid-rafts* abhängig ist, liegt der Schluss nahe, dass die richtige Lipidumgebung für die Aufnahme entscheidend ist (Schmitter *et al.* 2007, Korotkova *et al.* 2008b). CEA und CEACAM6 besitzen einen GPI-Anker und lokalisieren daher in *Lipid-rafts* (Screaton *et al.* 2000, Nicholson und Stanners 2006). CEACAM1 hingegen besitzt eine Transmembrandomäne und wird nur nach Rezeptordimerisierung in *Lipid-rafts* detektiert (Muller *et al.* 2005, Muenzner *et al.* 2008). Neben den *Lipid-rafts* ist die Aufnahme abhängig von der Aktivität der PI3K, die bei der CEACAM3-vermittelten Endocytose nicht benötigt wird (Buntru *et al.* 2011, Voges *et al.* 2012). Die PI3K-vermittelte bakterielle Internalisierung ist abhängig von den IgC2-Domänen von CEACAM1 (Voges *et al.* 2012). Es ist daher anzunehmen, dass die Aktivierung der PI3K durch Adaptermoleküle, die an die IgC2-Domänen binden hervorgerufen wird. Da die IgC2-Domänen zwischen den verschiedenen CEACAMs sehr ähnlich sind, binden diese bisher nicht identifizierten Adapterproteine wahrscheinlich auch an die IgC2-Domänen von CEA bzw. CEACAM6, wodurch das Bindungssignal in die Zelle weitergeleitet werden könnte (Tchoupa *et al.* 2014). *H. pylori* wird als nicht invasives Bakterium betrachtet, obwohl es zahlreiche Studien gibt, die eine Endocytose des Bakteriums aufzeigen (Amieva *et al.* 2002, Semino-Mora *et al.* 2003, Necchi *et al.* 2007). Es ist somit denkbar, dass durch die Bindung von *H. pylori* an CEACAMs auch eine Endocytose hervorgerufen wird, so wie es bei Neisserien bzw. *E. coli* der Fall ist. Dies gilt es näher zu untersuchen. Gerade die Annahme, dass *H. pylori* auch mittels CEACAM3 in Granulocyten aufgenommen wird, um dort eliminiert zu werden, liegt nahe.

Neben der Endocytose werden auch andere zelluläre Signale durch die Bindung an CEACAMs ausgelöst. Die Adhäsion von *M. catarrhalis* und *N. meningitidis* an CEACAM1 inhibiert die durch den Toll-ähnlichen Rezeptor 2 (*toll-like-receptor 2*, TLR2) initiierte NF- $\kappa$ B-abhängige inflammatorische Antwort (Slevogt *et al.* 2008). Die Tyrosinphosphorylierung des ITIMs von CEACAM1 führt zur Rekrutierung der Phosphatase SHP-1, die sich wiederum negativ auf die Funktion des TLR2 auswirkt (Slevogt *et al.* 2008). Diese Inhibierung unterstützt die Bakterien das Immunsystem zu umgehen.

Zusätzlich führt die Adhäsion an CEACAMs zu einer Stimulierung der Zell-Matrix-Interaktion (Muenzner *et al.* 2005). Für CEACAM1 konnte eine direkte Interaktion mit  $\beta$ 3-Integrin gezeigt werden (Brunner *et al.* 2001) und darüber hinaus eine Kolokalisierung mit  $\beta$ 1-Integrin (Kirshner *et al.* 2004), die ebenfalls für CEA demonstriert wurde (Camacho-Leal *et al.* 2007). Die Kolokalisierungen deuten auf eine direkte Interaktion zwischen CEACAMs und  $\beta$ -Integrinen hin, die bisher aber nicht

bewiesen werden konnte. Die Adhäsion von Bakterien an CEACAM1 bzw. 6 führt zur *de-novo*-Synthese von CD105 (Endoglin), ein Mitglied der TGF- $\beta$ 1 Rezeptorenfamilie (Muenzner *et al.* 2005). Dies moduliert wiederum die Integrinaffinität zur EZM, wodurch die Zelladhäsion an die EZM erhöht wird (Muenzner *et al.* 2005). Die Aktivierung der CD105-Synthese konnte für *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* und *M. catarrhalis* gezeigt werden. Die erhöhte Zell-Matrix-Interaktion führt dazu, dass die Bakterien vor der Eliminierung durch abschiefernde Zellen geschützt sind (Muenzner *et al.* 2010). Es stellt sich somit die Frage, ob auch *H. pylori* durch Bindung an CEACAMs die Produktion von CD105 induziert und dadurch unter anderem die Translokation von CagA ermöglicht wird. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass die HopQ-abhängige Bindung von *H. pylori* an AGS-Zellen nicht zu einer Steigerung der CD105-Menge führt (V. Königer, persönliche Kommunikation). Die Ergebnisse von Muenzner *et al.* (2005) resultieren hingegen aus Infektionsexperimenten mit HEK-293-Zellen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von CD105 in HEK-293-Zellen nach der Bindung von *H. pylori* an CEACAMs ausgelöst wird, die dann die Translokation von CagA in diesen Zellen ermöglicht.

Die Adhäsion von Bakterien an CEACAMs kann zur Auslösung einer Reihe von Signaltransduktionskaskaden führen. Für die neu entdeckte Bindung von *H. pylori* an CEACAMs ist dieser Teil der Interaktion bisher nicht untersucht und sollte den Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten darstellen.

#### 4.7 Der Zusammenhang zwischen CEACAMs und Krebs

Krebs ist die erste offensichtliche Gemeinsamkeit von CEACAMs und *H. pylori*. Vor über 50 Jahren wurde das karzinoembryonale Antigen (CEA, CEACAM5) als Tumormarker identifiziert (Beauchemin und Arabzadeh 2013). Der Rezeptor kommt jedoch nicht nur in verändertem Gewebe vor, sondern spielt vor allem bei der embryonalen und fötalen Entwicklung eine Rolle. Im erwachsenen Menschen wird CEA unter anderem im Magen, Zunge und Speiseröhre exprimiert (Hammarstrom 1999). Eine Überexpression von CEA kommt in verschiedenen Krebsarten vor, darunter Darm- und Magenkrebs (Jothy *et al.* 1993, Kodera *et al.* 1993). Neben CEA wird auch CEACAM6 vermehrt im Krebsgewebe produziert (Beauchemin und Arabzadeh 2013). CEACAM1 hingegen besitzt tumorsupprimierende Eigenschaften (Kunath *et al.* 1995, Nittka *et al.* 2004), ist aber auch in manch aggressiven Krebsarten stark überexprimiert wie beispielsweise Magenkrebs (Zhou *et al.* 2009).

Eine Infektion mit *H. pylori* kann in manchen Fällen zu Krebs führen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist dabei jedoch unbekannt, obwohl das Cytotoxin CagA damit in Verbindung gebracht wird. Für *H. pylori* ist es von Vorteil, an Strukturen binden zu können, die in entzündetem bzw. entartetem Magengewebe vorkommen. Die Adhäsion an sialysierte Lewis-Antigene durch das äußere Membranprotein SabA

ermöglicht es den Bakterien, auch zu späteren Zeitpunkten der Infektion eine Interaktion zum Epithel herzustellen (Mahdavi *et al.* 2002). Dadurch wird Persistenz der Bakterien auch bei verändertem Gewebe gewährleistet. Die Bindung von HopQ an CEACAMs könnte eine ähnliche Rolle bei einer Infektion von *H. pylori* spielen, da die epithelialen CEACAMs im malignem Gewebe überexprimiert sind.

Aus dem Zusammenhang zwischen CEACAMs und Krebs bzw. *H. pylori* und Krebs ergibt sich die interessante Frage, ob durch eine Infektion von *H. pylori* die Expression von CEACAMs, womöglich in Abhängigkeit von CagA, induziert wird. Zum einen könnte *H. pylori* dadurch seine Bindung an die Epithelzellen erhöhen, zum anderen könnte es ein Erklärungsansatz dafür sein, warum eine Infektion mit *H. pylori* zu Krebs führen kann.

#### 4.8 Schlussfolgerung

CEACAMs sind die ersten identifizierten Proteinrezeptoren von *H. pylori*. Die neuartige Interaktion zwischen HopQ und der IgV-Domäne von CEA, CEACAM1, 3 und 6 löst eine starke Affinität der Bakterien zu HEK-293-Zellen aus. Diese Bindung macht die CagA-Translokation in diesen Zellen erst möglich. Ob der durch die Proteininteraktion ausgelöste enge Kontakt der Bakterien zu den Zellen allein ausreicht, die CagA-Translokation zu ermöglichen, bleibt ungeklärt. Neben dem reinen Kontakt können vielseitige Signale innerhalb der Zellen ausgelöst werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Da der Zusammenhang zwischen der HopQ-CEACAM-Bindung und der CagA-Translokation nicht geklärt ist, sollte der Fokus zukünftiger Arbeiten auf den durch die Interaktion ausgelösten zellulären Signalen liegen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Bindung von *H. pylori* an CEACAMs im Gegensatz zu den anderen CEACAM-bindenden Bakterien nicht zu einer Signaltransduktion führt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bilden, zusammen mit den Daten von V. Königer (Königer, Holsten *et al.* Manuskript in Vorbereitung), die Basis für ein neues Feld innerhalb der *H. pylori*-Forschung, das zum Verständnis der Krebsentstehung durch eine *H. pylori*-Infektion beitragen könnte.



## 5 Literaturverzeichnis

Ahn, T., Yim, S. K., Choi, H. I. und Yun, C. H. (2001): Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal Biochem*, 291, S. 300-3.

Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A. und Berg, D. E. (1998): Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 28, S. 37-53.

Allen, L. A., Schlesinger, L. S. und Kang, B. (2000): Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med*, 191, S. 115-28.

Alm, R. A., Bina, J., Andrews, B. M., Doig, P., Hancock, R. E. und Trust, T. J. (2000): Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun*, 68, S. 4155-68.

Amieva, M. R., Salama, N. R., Tompkins, L. S. und Falkow, S. (2002): *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol*, 4, S. 677-90.

Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J. und Falkow, S. (2003): Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 300, S. 1430-4.

Aplin, A. E., Howe, A. K. und Juliano, R. L. (1999): Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 11, S. 737-44.

Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T. und Sasakawa, C. (2000): *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med*, 191, S. 593-602.

Ascencio, F., Fransson, L. A. und Wadstrom, T. (1993): Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J Med Microbiol*, 38, S. 240-4.

Atherton, J. C. (2006): The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, S. 63-96.

Backert, S., Tegtmeyer, N. und Selbach, M. (2010): The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter*, 15, S. 163-76.

Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M. und Meyer, T. F. (2000): Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*, 2, S. 155-64.

- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B. E. und Mobley, H. L. (1997): Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 40, S. 25-30.
- Beauchemin, N. und Arabzadeh, A. (2013): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 32, S. 643-71.
- Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A. und Stanners, C. P. (1987): Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol*, 7, S. 3221-30.
- Beauvais, D. M., Ell, B. J., McWhorter, A. R. und Rapraeger, A. C. (2009): Syndecan-1 regulates  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med*, 206, S. 691-705.
- Belogolova, E., Bauer, B., Pompaiah, M., Asakura, H., Brinkman, V., Ertl, C., Bartfeld, S., Nechitaylo, T. Y., Haas, R., Machuy, N., Salama, N., Churin, Y. und Meyer, T. F. (2013): *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol*, 15, S. 1896-912.
- Bishop, Joseph R., Schuksz, Manuela und Esko, Jeffrey D. (2007): Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446, S. 1030-1037.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. und Normark, S. (1993): Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262, S. 1892-5.
- Bos, M. P., Grunert, F. und Belland, R. J. (1997): Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 65, S. 2353-61.
- Bos, M. P., Hogan, D. und Belland, R. J. (1999): Homologue scanning mutagenesis reveals CD66 receptor residues required for neisserial Opa protein binding. *J Exp Med*, 190, S. 331-40.
- Bos, M. P., Kao, D., Hogan, D. M., Grant, C. C. und Belland, R. J. (2002): Carcinoembryonic antigen family receptor recognition by gonococcal Opa proteins requires distinct combinations of hypervariable Opa protein domains. *Infect Immun*, 70, S. 1715-23.
- Bos, M. P., Kuroki, M., Krop-Watorek, A., Hogan, D. und Belland, R. J. (1998): CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, S. 9584-9.
- Boyd, A. P., Sory, M. P., Iriarte, M. und Cornelis, G. R. (1998): Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the *Yersinia* Yop apparatus. *Mol Microbiol*, 27, S. 425-36.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, S. 248-54.

- Brown, D. A. und London, E. (1998): Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, S. 111-36.
- Brummer, J., Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Schumacher, U., Loning, T., Bamberger, A. M. und Wagener, C. (2001): cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol*, 159, S. 537-46.
- Brummer, J., Neumaier, M., Gopfert, C. und Wagener, C. (1995): Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene*, 11, S. 1649-55.
- Bucior, I., Pielage, J. F. und Engel, J. N. (2012): *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog*, 8, S. e1002616.
- Buntru, A., Kopp, K., Voges, M., Frank, R., Bachmann, V. und Hauck, C. R. (2011): Phosphatidylinositol 3'-kinase activity is critical for initiating the oxidative burst and bacterial destruction during CEACAM3-mediated phagocytosis. *J Biol Chem*, 286, S. 9555-66.
- Buntru, A., Roth, A., Nyffenegger-Jann, N. J. und Hauck, C. R. (2012): HemITAM signaling by CEACAM3, a human granulocyte receptor recognizing bacterial pathogens. *Arch Biochem Biophys*, 524, S. 77-83.
- Camacho-Leal, P. und Stanners, C. P. (2008): The human carcinoembryonic antigen (CEA) GPI anchor mediates anoikis inhibition by inactivation of the intrinsic death pathway. *Oncogene*, 27, S. 1545-53.
- Camacho-Leal, P., Zhai, A. B. und Stanners, C. P. (2007): A co-clustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *J Cell Physiol*, 211, S. 791-802.
- Cao, P. und Cover, T. L. (2002): Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 40, S. 4504-11.
- Carulli, S., Beck, K., Dayan, G., Boulesteix, S., Lortat-Jacob, H. und Rousselle, P. (2012): Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin alpha3 LG45 protein domain. *J Biol Chem*, 287, S. 12204-16.
- Cascales, E. und Christie, P. J. (2003): The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 1, S. 137-49.
- Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., Bansil, R. und Erramilli, S. (2007): Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*, 8, S. 1580-6.
- Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C. P., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., So, P., Erramilli, S. und Bansil, R. (2009): *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, S. 14321-6.

- Cendron, L., Couturier, M., Angelini, A., Barison, N., Stein, M. und Zanotti, G. (2009): The *Helicobacter pylori* CagD (HP0545, Cag24) protein is essential for CagA translocation and maximal induction of interleukin-8 secretion. *J Mol Biol*, 386, S. 204-17.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. und Covacci, A. (1996): *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, S. 14648-53.
- Charbonneau, J. und Stanners, C. P. (1999): Role of carbohydrate structures in CEA-mediated intercellular adhesion. *Cell Adhes Commun*, 7, S. 233-44.
- Chen, T. und Gotschlich, E. C. (1996): CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, S. 14851-6.
- Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A. und Bolland, S. (2001): Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J Leukoc Biol*, 70, S. 335-40.
- Chen, Y., Gotte, M., Liu, J. und Park, P. W. (2008): Microbial subversion of heparan sulfate proteoglycans. *Mol Cells*, 26, S. 415-26.
- Cheung, P. H., Luo, W., Qiu, Y., Zhang, X., Earley, K., Millirons, P. und Lin, S. H. (1993): Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J Biol Chem*, 268, S. 24303-10.
- Chevinsky, A. H. (1991): CEA in tumors of other than colorectal origin. *Semin Surg Oncol*, 7, S. 162-6.
- Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W. und Naumann, M. (2003): *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol*, 161, S. 249-55.
- Colbeck, J. C., Hansen, L. M., Fong, J. M. und Solnick, J. V. (2006): Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 74, S. 4375-8.
- Couchman, John R. (2010): Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, S. 89-114.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrone, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. und et al. (1993): Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, S. 5791-5.
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. und Rappuoli, R. (1999): *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284, S. 1328-33.
- Cover, T. L. und Blanke, S. R. (2005): *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3, S. 320-32.

- Cover, T. L., Dooley, C. P. und Blaser, M. J. (1990): Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun*, 58, S. 603-10.
- Dailidiene, D., Dailide, G., Kersulyte, D. und Berg, D. E. (2006): Contraselectable Streptomycin Susceptibility Determinant for Genetic Manipulation and Analysis of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, S. 5908-5914.
- de Vries, F. P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M. und van Putten, J. P. (1998): *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol*, 27, S. 1203-12.
- Debowski, A. W., Gauntlett, J. C., Li, H., Liao, T., Sehnal, M., Nilsson, H. O., Marshall, B. J. und Benghezal, M. (2012): Xer-cise in *Helicobacter pylori*: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. *Helicobacter*, 17, S. 435-43.
- Driscoll, P. C., Cyster, J. G., Campbell, I. D. und Williams, A. F. (1991): Structure of domain 1 of rat T lymphocyte CD2 antigen. *Nature*, 353, S. 762-5.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R. und Krakowka, S. (1991): Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 59, S. 2470-5.
- Eaton, K. A., Morgan, D. R. und Krakowka, S. (1992): Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 37, S. 123-7.
- Eidelman, F. J., Fuks, A., DeMarte, L., Taheri, M. und Stanners, C. P. (1993): Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J Cell Biol*, 123, S. 467-75.
- Ertl, Claudia. (2012): Interaktion des Cag-TypIV-Sekretionssystems von *Helicobacter pylori* mit  $\beta$ 1-Integrin zur Untersuchung des Translokationsmechanismus des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA). Dissertation, Technische Universität München.
- Fischer, W. (2011): Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J*, 278, S. 1203-12.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001): Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*, 42, S. 1337-48.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Zimmer, R. und Haas, R. (2010): Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res*, 38, S. 6089-101.
- Franco, A. T., Israel, D. A., Washington, M. K., Krishna, U., Fox, J. G., Rogers, A. B., Neish, A. S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G. I., Hatakeyama, M., Whitehead, R., Gaus, K., O'Brien, D. P., Romero-Gallo, J. und Peek, R. M., Jr. (2005): Activation of

- beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, S. 10646-51.
- Freissler, E., Meyer auf der Heyde, A., David, G., Meyer, T. F. und Dehio, C. (2000): Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. *Cell Microbiol*, 2, S. 69-82.
- Galmiche, A. und Rassow, J. (2010): Targeting of *Helicobacter pylori* VacA to mitochondria. *Gut Microbes*, 1, S. 392-5.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R. und Haas, R. (2003): *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 301, S. 1099-102.
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999): Integrin signaling. *Science*, 285, S. 1028-32.
- Girard, V. und Mourez, M. (2006): Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol*, 157, S. 407-16.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, S. 59-74.
- Grant, C. C., Bos, M. P. und Belland, R. J. (1999): Proteoglycan receptor binding by *Neisseria gonorrhoeae* MS11 is determined by the HV-1 region of OpaA. *Mol Microbiol*, 32, S. 233-42.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, S. 4645-9.
- Gray-Owen, S. D. und Blumberg, R. S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, S. 433-46.
- Gray-Owen, S. D., Lorenzen, D. R., Haude, A., Meyer, T. F. und Dehio, C. (1997): Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, 26, S. 971-80.
- Guzman-Murillo, M. A., Ruiz-Bustos, E., Ho, B. und Ascencio, F. (2001): Involvement of the heparan sulphate-binding proteins of *Helicobacter pylori* in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. *J Med Microbiol*, 50, S. 320-9.
- Hammarstrom, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 9, S. 67-81.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, S. 557-80.
- Hauck, C. R., Agerer, F., Muenzner, P. und Schmitter, T. (2006): Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol*, 85, S. 235-42.

- Hauck, C. R. und Meyer, T. F. (2003): 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol*, 6, S. 43-9.
- Hauck, C. R., Meyer, T. F., Lang, F. und Gulbins, E. (1998): CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J*, 17, S. 443-54.
- Hefta, S. A., Hefta, L. J., Lee, T. D., Paxton, R. J. und Shively, J. E. (1988): Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, S. 4648-52.
- Hennig, E. E., Allen, J. M. und Cover, T. L. (2006): Multiple chromosomal loci for the babA gene in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 74, S. 3046-51.
- Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., Higuchi, M., Takahashi, A., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Tanaka, S., Azuma, T. und Hatakeyama, M. (2004): *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem*, 279, S. 17205-16.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. und Hatakeyama, M. (2002): SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295, S. 683-6.
- Hill, D. J., Toleman, M. A., Evans, D. J., Villullas, S., Van Alphen, L. und Virji, M. (2001): The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol Microbiol*, 39, S. 850-62.
- Hill, D. J. und Virji, M. (2003): A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol*, 48, S. 117-29.
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A. und Beauchemin, N. (1999): The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J Biol Chem*, 274, S. 335-44.
- Hynes, R. O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, S. 673-87.
- Ilantzis, C., DeMarte, L., Screaton, R. A. und Stanners, C. P. (2002): Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, 4, S. 151-63.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L. und Boren, T. (1998): *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279, S. 373-7.

- Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Boren, T., Haas, R., Sasakawa, C. und Mimuro, H. (2011): BabA-mediated Adherence Is a Potentiator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286, S. 25256-25264.
- Jessup, J. M., Kim, J. C., Thomas, P., Ishii, S., Ford, R., Shively, J. E., Durbin, H., Stanners, C. P., Fuks, A., Zhou, H. und et al. (1993): Adhesion to carcinoembryonic antigen by human colorectal carcinoma cells involves at least two epitopes. *Int J Cancer*, 55, S. 262-8.
- Jimenez-Soto, L. F., Clausen, S., Sprenger, A., Ertl, C. und Haas, R. (2013): Dynamics of the Cag-type IV secretion system of *Helicobacter pylori* as studied by bacterial co-infections. *Cell Microbiol*, 15, S. 1924-37.
- Jimenez-Soto, L. F., Kutter, S., Sewald, X., Ertl, C., Weiss, E., Kapp, U., Rohde, M., Pirch, T., Jung, K., Retta, S. F., Terradot, L., Fischer, W. und Haas, R. (2009): *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog*, 5, S. e1000684.
- Jothy, S., Yuan, S. Y. und Shirota, K. (1993): Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. In situ hybridization study and implication for a new in vivo functional model. *Am J Pathol*, 143, S. 250-7.
- Kavermann, H., Burns, B. P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K. und Haas, R. (2003): Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med*, 197, S. 813-22.
- Kawasaki, H., Sugumaran, G. und Silbert, J. E. (1996): Cell surface glycosaminoglycans are not involved in the adherence of *Helicobacter pylori* to cultured Hs 198.St human gastric cells, Hs 746T human gastric adenocarcinoma cells, or HeLa cells. *Glycoconj J*, 13, S. 873-7.
- Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S. und Pawson, T. (1998): The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcgamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol*, 18, S. 4209-20.
- Kim, C., Ye, F. und Ginsberg, M. H. (2011): Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, S. 321-45.
- Kirshner, J., Hardy, J., Wilczynski, S. und Shively, J. E. (2004): Cell-cell adhesion molecule CEACAM1 is expressed in normal breast and milk and associates with beta1 integrin in a 3D model of morphogenesis. *J Mol Histol*, 35, S. 287-99.
- Klaile, E., Vorontsova, O., Sigmundsson, K., Muller, M. M., Singer, B. B., Ofverstedt, L. G., Svensson, S., Skoglund, U. und Obrink, B. (2009): The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters. *J Cell Biol*, 187, S. 553-67.
- Kline, K. A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S. und Henriques-Normark, B. (2009): Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*, 5, S. 580-92.



- Kodera, Y., Isobe, K., Yamauchi, M., Satta, T., Hasegawa, T., Oikawa, S., Kondoh, K., Akiyama, S., Itoh, K., Nakashima, I. und et al. (1993): Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br J Cancer*, 68, S. 130-6.
- Königer, V., Holsten, L., Loell, E., Busch, B., Bonsor, D. A., Breithaupt, U., Roth, A., Kengmo-Tchoupa, A., Smith, S. I., Mueller, S., Sundberg, E. J., Zimmermann, W., Fischer, W., Hauck, C. R. und Haas, R. (Manuskript in Vorbereitung): *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs for adherence and translocation of CagA.
- Korotkova, N., Cota, E., Lebedin, Y., Monpouet, S., Guignot, J., Servin, A. L., Matthews, S. und Moseley, S. L. (2006): A subfamily of Dr adhesins of *Escherichia coli* bind independently to decay-accelerating factor and the N-domain of carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem*, 281, S. 29120-30.
- Korotkova, N., Yang, Y., Le Trong, I., Cota, E., Demeler, B., Marchant, J., Thomas, W. E., Stenkamp, R. E., Moseley, S. L. und Matthews, S. (2008a): Binding of Dr adhesins of *Escherichia coli* to carcinoembryonic antigen triggers receptor dissociation. *Mol Microbiol*, 67, S. 420-34.
- Korotkova, N., Yarova-Yarovaya, Y., Tchesnokova, V., Yazvenko, N., Carl, M. A., Stapleton, A. E. und Moseley, S. L. (2008b): *Escherichia coli* DraE adhesin-associated bacterial internalization by epithelial cells is promoted independently by decay-accelerating factor and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule binding and does not require the DraD invasin. *Infect Immun*, 76, S. 3869-80.
- Krop-Watorek, A., Oikawa, S., Oyama, Y. und Nakazato, H. (1998): Oligomerization of N-terminal domain of carcinoembryonic antigen (CEA) expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 242, S. 79-83.
- Kuespert, K., Pils, S. und Hauck, C. R. (2006): CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 18, S. 565-71.
- Kuespert, K., Weibel, S. und Hauck, C. R. (2007): Profiling of bacterial adhesin--host receptor recognition by soluble immunoglobulin superfamily domains. *J Microbiol Methods*, 68, S. 478-85.
- Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L. J., Nagel, G., van der Schoot, C. E., Grunert, F. und Roos, D. (1992): CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J Cell Biol*, 118, S. 457-66.
- Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C. und Beauchemin, N. (1995): Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*, 11, S. 2375-82.
- Kuroki, M., Abe, H., Imakiirei, T., Liao, S., Uchida, H., Yamauchi, Y., Oikawa, S. und Kuroki, M. (2001): Identification and comparison of residues critical for cell-adhesion activities of two neutrophil CD66 antigens, CEACAM6 and CEACAM8. *J Leukoc Biol*, 70, S. 543-50.

- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W. und Backert, S. (2007): *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 449, S. 862-6.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, S. 680-5.
- Lai, C. H., Chang, Y. C., Du, S. Y., Wang, H. J., Kuo, C. H., Fang, S. H., Fu, H. W., Lin, H. H., Chiang, A. S. und Wang, W. C. (2008): Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect Immun*, 76, S. 3293-303.
- Leusch, H. G., Drzeniek, Z., Markos-Pusztai, Z. und Wagener, C. (1991): Binding of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect Immun*, 59, S. 2051-7.
- Liang, O. D., Ascencio, F., Fransson, L. A. und Wadstrom, T. (1992): Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 60, S. 899-906.
- Lingwood, D. und Simons, K. (2010): Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327, S. 46-50.
- Loh, J. T., Torres, V. J., Algood, H. M., McClain, M. S. und Cover, T. L. (2008): *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett*, 289, S. 53-8.
- Lucka, L., Fernando, M., Grunow, D., Kannicht, C., Horst, A. K., Nollau, P. und Wagener, C. (2005): Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology*, 15, S. 87-100.
- Magalhaes, A., Marcos, N. T., Carvalho, A. S., David, L., Figueiredo, C., Bastos, J., David, G. und Reis, C. A. (2009): *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island-positive strains induce syndecan-4 expression in gastric epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56, S. 223-32.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L. und Boren, T. (2002): *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297, S. 573-8.
- Malorny, B., Morelli, G., Kusecek, B., Kolberg, J. und Achtman, M. (1998): Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J Bacteriol*, 180, S. 1323-30.
- Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Katz, G., Nechama, M., Blumberg, R. S., Kammerer, R., Zimmermann, W. und Mandelboim, O. (2004): The critical role of residues 43R and 44Q of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules-1 in the protection from killing by human NK cells. *J Immunol*, 173, S. 3732-9.

- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B. und Glancy, R. J. (1985): Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*, 142, S. 436-9.
- Marshall, B. J. und Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, S. 1311-5.
- Marshall, T. und Williams, K. M. (1992): Recovery of protein by coomassie brilliant blue precipitation prior to electrophoresis. *Electrophoresis*, 13, S. 887-8.
- McCaw, S. E., Liao, E. H. und Gray-Owen, S. D. (2004): Engulfment of *Neisseria gonorrhoeae*: Revealing Distinct Processes of Bacterial Entry by Individual Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecule Family Receptors. *Infection and Immunity*, 72, S. 2742-2752.
- McCaw, S. E., Schneider, J., Liao, E. H., Zimmermann, W. und Gray-Owen, S. D. (2003): Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor. *Mol Microbiol*, 49, S. 623-37.
- Mikula, K. M., Kolodziejczyk, R. und Goldman, A. (2012): *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, S. 169.
- Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, C. P. und Dustin, M. L. (1995): Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med*, 182, S. 1231-41.
- Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Haimovich, B., Backert, S. und Meyer, T. F. (2007): The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol*, 9, S. 1148-61.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A. und Montecucco, C. (1998): Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med*, 187, S. 135-40.
- Muenzner, P., Bachmann, V., Kuespert, K. und Hauck, C. R. (2008): The CEACAM1 transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of human pathogens via membrane microdomains. *Cell Microbiol*, 10, S. 1074-92.
- Muenzner, P., Bachmann, V., Zimmermann, W., Hentschel, J. und Hauck, C. R. (2010): Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science*, 329, S. 1197-201.
- Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S. und Hauck, C. R. (2005): CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J Cell Biol*, 170, S. 825-36.
- Muller, M. M., Singer, B. B., Klaile, E., Obrink, B. und Lucka, L. (2005): Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood*, 105, S. 3925-34.

- Murata-Kamiya, N. (2011): Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect*, 13, S. 799-807.
- Murata-Kamiya, N., Kikuchi, K., Hayashi, T., Higashi, H. und Hatakeyama, M. (2010): *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe*, 7, S. 399-411.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R. M., Jr., Azuma, T. und Hatakeyama, M. (2007): *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, 26, S. 4617-26.
- N'Guessan, P. D., Vigelahn, M., Bachmann, S., Zabel, S., Opitz, B., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Zweigner, J., Riesbeck, K., Singer, B. B., Suttorp, N. und Slevogt, H. (2007): The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. *J Infect Dis*, 195, S. 1651-60.
- Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T. W., Watt, S. M., Thompson, J. und Zimmermann, W. (1993): Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur J Biochem*, 214, S. 27-35.
- Nägele, Virginie. (2010): Funktionelle Charakterisierung trimerer Autotransporteradhäsine von *Neisseria meningitidis* (NadA) und *Yersinia enterocolitica* (YadA) Dissertation, Technische Universität München.
- Necchi, V., Candusso, M. E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., Ricci, V. und Solcia, E. (2007): Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 132, S. 1009-23.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P. und Wagener, C. (1993): Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, S. 10744-8.
- Nguyen, V. Q., Caprioli, R. M. und Cover, T. L. (2001): Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun*, 69, S. 543-6.
- Nicholson, T. B. und Stanners, C. P. (2006): Specific inhibition of GPI-anchored protein function by homing and self-association of specific GPI anchors. *J Cell Biol*, 175, S. 647-59.
- Nittka, S., Gunther, J., Ebisch, C., Erbersdobler, A. und Neumaier, M. (2004): The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 23, S. 9306-13.
- Obrink, B. (1997): CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol*, 9, S. 616-26.

- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. und Haas, R. (2000): Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287, S. 1497-500.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. und Hatakeyama, M. (2008): Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, S. 1003-8.
- Oikawa, S., Sugiyama, M., Kuroki, M., Kuroki, M. und Nakazato, H. (2000): Extracellular N-domain alone can mediate specific heterophilic adhesion between members of the carcinoembryonic antigen family, CEACAM6 and CEACAM8. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, S. 564-8.
- Ordonez, C., Screaton, R. A., Ilantzis, C. und Stanners, C. P. (2000): Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res*, 60, S. 3419-24.
- Ordonez, C., Zhai, A. B., Camacho-Leal, P., Demarte, L., Fan, M. M. und Stanners, C. P. (2007): GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interaction. *J Cell Physiol*, 210, S. 757-65.
- Palframan, S. L., Kwok, T. und Gabriel, K. (2012): Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, S. 92.
- Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K. D., Hundt, E. und Knapp, B. (1999): Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, 27, S. 3325-33.
- Pils, S., Gerrard, D. T., Meyer, A. und Hauck, C. R. (2008): CEACAM3: an innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 298, S. 553-60.
- Pils, S., Kopp, K., Peterson, L., Delgado Tascon, J., Nyffenegger-Jann, N. J. und Hauck, C. R. (2012): The adaptor molecule Nck localizes the WAVE complex to promote actin polymerization during CEACAM3-mediated phagocytosis of bacteria. *PLoS One*, 7, S. e32808.
- Popp, A., Dehio, C., Grunert, F., Meyer, T. F. und Gray-Owen, S. D. (1999): Molecular analysis of neisserial Opa protein interactions with the CEA family of receptors: identification of determinants contributing to the differential specificities of binding. *Cell Microbiol*, 1, S. 169-81.
- Poppe, M., Feller, S. M., Romer, G. und Wessler, S. (2007): Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*, 26, S. 3462-72.
- Posselt, G., Backert, S. und Wessler, S. (2013): The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal*, 11, S. 77.

- Potter, B. A., Weixel, K. M., Bruns, J. R., Ihrke, G. und Weisz, O. A. (2006): N-glycans mediate apical recycling of the sialomucin endolyn in polarized MDCK cells. *Traffic*, 7, S. 146-54.
- Pride, D. T. und Blaser, M. J. (2002): Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol*, 316, S. 629-42.
- Rad, R., Gerhard, M., Lang, R., Schoniger, M., Rosch, T., Schepp, W., Becker, I., Wagner, H. und Prinz, C. (2002): The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol*, 168, S. 3033-41.
- Reilly, P. L., Woska, J. R., Jr., Jeanfavre, D. D., McNally, E., Rothlein, R. und Bormann, B. J. (1995): The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol*, 155, S. 529-32.
- Rolig, A. S., Shanks, J., Carter, J. E. und Ottemann, K. M. (2012): *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. *Infect Immun*, 80, S. 3713-20.
- Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I. G., Magalhaes, A., Ecobichon, C., Reis, C. A., Cieniewski-Bernard, C., Joncquel Chevalier Curt, M., Leonard, R., Maes, E., Sperandio, B., Slomianny, C., Sansonetti, P. J., Michalski, J. C. und Robbe-Masselot, C. (2014): The LacdiNAc-Specific Adhesin LabA Mediates Adhesion of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Mucosa. *J Infect Dis*.
- Roy, K., Hilliard, G. M., Hamilton, D. J., Luo, J., Ostmann, M. M. und Fleckenstein, J. M. (2009): Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature*, 457, S. 594-8.
- Ruiz-Bustos, E., Ochoa, J. L., Wadstrom, T. und Ascencio, F. (2001): Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *J Med Microbiol*, 50, S. 215-22.
- Ruoslahti, E. und Obrink, B. (1996): Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res*, 227, S. 1-11.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. und Hatakeyama, M. (2007): *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, 447, S. 330-3.
- Sadarangani, M., Pollard, A. J. und Gray-Owen, S. D. (2011): Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol Rev*, 35, S. 498-514.
- Salama, N. R., Hartung, M. L. und Muller, A. (2013): Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, 11, S. 385-99.

Sambrook J., Russell D. W. (2001): MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

Sauter, S. L., Rutherford, S. M., Wagener, C., Shively, J. E. und Hefta, S. A. (1993): Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *Escherichia coli* on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem*, 268, S. 15510-6.

Schmitt, W. und Haas, R. (1994): Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol*, 12, S. 307-19.

Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P. und Hauck, C. R. (2004): Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*, 199, S. 35-46.

Schmitter, T., Pils, S., Weibel, S., Agerer, F., Peterson, L., Buntru, A., Kopp, K. und Hauck, C. R. (2007): Opa proteins of pathogenic neisseriae initiate Src kinase-dependent or lipid raft-mediated uptake via distinct human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule isoforms. *Infect Immun*, 75, S. 4116-26.

Schreiber, S., Buckner, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gattermann, S., Josenhans, C. und Suerbaum, S. (2005): Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun*, 73, S. 1584-9.

Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C. und Suerbaum, S. (2004): The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, S. 5024-9.

Screaton, R. A., DeMarte, L., Draber, P. und Stanners, C. P. (2000): The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidyl-inositol anchor. *J Cell Biol*, 150, S. 613-26.

Segal, E. D. und Tompkins, L. S. (1993): Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. *Biotechniques*, 14, S. 225-6.

Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R. und Meyer, T. F. (2004): The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics*, 4, S. 2961-8.

Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F. und Backert, S. (2003): The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J*, 22, S. 515-28.

Selbach, M., Moese, S., Meyer, T. F. und Backert, S. (2002): Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun*, 70, S. 665-71.

Semino-Mora, C., Doi, S. Q., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I. und Dubois, A. (2003): Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis*, 187, S. 1165-77.

- Sheu, B. S., Yang, H. B., Yeh, Y. C. und Wu, J. J. (2010): *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: a bug's first step is a novel target for us. *J Gastroenterol Hepatol*, 25, S. 26-32.
- Shrivastava, R. und Miller, J. F. (2009): Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Curr Opin Microbiol*, 12, S. 88-93.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, S. 31-9.
- Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, S. 720-31.
- Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'Guessan P, D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N. und Singer, B. B. (2008): CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*, 9, S. 1270-8.
- Smith, M. F., Jr., Novotny, J., Carl, V. S. und Comeau, L. D. (2006): *Helicobacter pylori* and toll-like receptor agonists induce syndecan-4 expression in an NF-kappaB-dependent manner. *Glycobiology*, 16, S. 221-9.
- Stanley, P. (1989): Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol Cell Biol*, 9, S. 377-83.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J. und Covacci, A. (2002): c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*, 43, S. 971-80.
- Strugatsky, D., McNulty, R., Munson, K., Chen, C. K., Soltis, S. M., Sachs, G. und Luecke, H. (2013): Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 493, S. 255-8.
- Suerbaum, S. und Michetti, P. (2002): *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347, S. 1175-86.
- Sundrud, M. S., Torres, V. J., Unutmaz, D. und Cover, T. L. (2004): Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, S. 7727-32.
- Sycuro, L. K., Pincus, Z., Gutierrez, K. D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W. und Salama, N. R. (2010): Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell*, 141, S. 822-33.
- Taheri, M., Saragovi, H. U. und Stanners, C. P. (2003): The adhesion and differentiation-inhibitory activities of the immunoglobulin superfamily member, carcinoembryonic antigen, can be independently blocked. *J Biol Chem*, 278, S. 14632-9.



- Taheri, M., Saragovi, U., Fuks, A., Makkerh, J., Mort, J. und Stanners, C. P. (2000): Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem*, 275, S. 26935-43.
- Takagi, J., Erickson, H. P. und Springer, T. A. (2001): C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Nat Struct Biol*, 8, S. 412-6.
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. und Springer, T. A. (2002): Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110, S. 599-11.
- Talarico, S., Whitefield, S. E., Fero, J., Haas, R. und Salama, N. R. (2012): Regulation of *Helicobacter pylori* adherence by gene conversion. *Mol Microbiol*, 84, S. 1050-61.
- Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., Konig, W. und Backert, S. (2007): Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, 132, S. 1309-19.
- Tan, S., Tompkins, L. S. und Amieva, M. R. (2009): *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog*, 5, S. e1000407.
- Tchoupa, A. K., Schuhmacher, T. und Hauck, C. R. (2014): Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal*, 12, S. 27.
- Teixeira, A. M., Fawcett, J., Simmons, D. L. und Watt, S. M. (1994): The N-domain of the biliary glycoprotein (BGP) adhesion molecule mediates homotypic binding: domain interactions and epitope analysis of BGPC. *Blood*, 84, S. 211-9.
- Terebiznik, M. R., Raju, D., Vazquez, C. L., Torbricki, K., Kulkarni, R., Blanke, S. R., Yoshimori, T., Colombo, M. I. und Jones, N. L. (2009): Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy*, 5, S. 370-9.
- Terry, K., Williams, S. M., Connolly, L. und Ottemann, K. M. (2005): Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infect Immun*, 73, S. 803-11.
- Thompson, J., Seitz, M., Chastre, E., Ditter, M., Aldrian, C., Gespach, C. und Zimmermann, W. (1997): Down-regulation of carcinoembryonic antigen family member 2 expression is an early event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 57, S. 1776-84.
- Tkachenko, E. und Simons, M. (2002): Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J Biol Chem*, 277, S. 19946-51.
- Tojkander, S., Gateva, G. und Lappalainen, P. (2012): Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*, 125, S. 1855-64.
- Toller, I. M., Neelsen, K. J., Steger, M., Hartung, M. L., Hottiger, M. O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A. A., Lopes, M. und Muller, A. (2011): Carcinogenic

bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, S. 14944-9.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M. und Venter, J. C. (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388, S. 539-47.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, S. 145-9.

Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M. und Hatakeyama, M. (2003): Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*, 278, S. 3664-70.

Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H. und Hatakeyama, M. (2006): Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol*, 26, S. 261-76.

van der Merwe, P. A. und Barclay, A. N. (1994): Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*, 19, S. 354-8.

van Putten, J. P., Duensing, T. D. und Cole, R. L. (1998): Entry of OpaA<sup>+</sup> gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol Microbiol*, 29, S. 369-79.

van Putten, J. P. und Paul, S. M. (1995): Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *EMBO J*, 14, S. 2144-54.

Vaughn, D. E. und Bjorkman, P. J. (1996): The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron*, 16, S. 261-73.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J. und Ferrero, R. L. (2004): Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5, S. 1166-74.

Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A. und Watt, S. M. (2000): Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 36, S. 784-95.

Virji, M., Evans, D., Hadfield, A., Grunert, F., Teixeira, A. M. und Watt, S. M. (1999): Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria*

gonorrhoeae: identification of Opa adhesiotopes on the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol*, 34, S. 538-51.

Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J. und Watt, S. M. (1996a): Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol*, 22, S. 941-50.

Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K. und Doyonnas, R. (1996b): The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, 22, S. 929-39.

Voges, M., Bachmann, V., Naujoks, J., Kopp, K. und Hauck, C. R. (2012): Extracellular IgC2 constant domains of CEACAMs mediate PI3K sensitivity during uptake of pathogens. *PLoS One*, 7, S. e39908.

Wang, J., Gray-Owen, S. D., Knorre, A., Meyer, T. F. und Dehio, C. (1998): Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol Microbiol*, 30, S. 657-71.

Watt, S. M., Teixeira, A. M., Zhou, G. Q., Doyonnas, R., Zhang, Y., Grunert, F., Blumberg, R. S., Kuroki, M., Skubitz, K. M. und Bates, P. A. (2001): Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood*, 98, S. 1469-79.

Webb, D. C. und Cripps, A. W. (1998): Secondary structure and molecular analysis of interstrain variability in the P5 outer-membrane protein of non-typable *Haemophilus influenzae* isolated from diverse anatomical sites. *J Med Microbiol*, 47, S. 1059-67.

Wessner, D. R., Shick, P. C., Lu, J. H., Cardellicchio, C. B., Gagneten, S. E., Beauchemin, N., Holmes, K. V. und Dveksler, G. S. (1998): Mutational analysis of the virus and monoclonal antibody binding sites in MHVR, the cellular receptor of the murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol*, 72, S. 1941-8.

Whiteford, J. R. und Couchman, J. R. (2006): A conserved NXIP motif is required for cell adhesion properties of the syndecan-4 ectodomain. *J Biol Chem*, 281, S. 32156-63.

Wikstrom, K., Kjellstrom, G. und Obrink, B. (1996): Homophilic intercellular adhesion mediated by C-CAM is due to a domain 1-domain 1 reciprocal binding. *Exp Cell Res*, 227, S. 360-6.

Wotherspoon, A. C. (1998): *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br Med Bull*, 54, S. 79-85.

Wroblewski, L. E., Peek, R. M., Jr. und Wilson, K. T. (2010): *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, 23, S. 713-39.

Yahiro, K., Satoh, M., Nakano, M., Hisatsune, J., Isomoto, H., Sap, J., Suzuki, H., Nomura, F., Noda, M., Moss, J. und Hirayama, T. (2012): Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. *J Biol Chem*, 287, S. 31104-15.

- Yamanka, T., Kuroki, M., Matsuo, Y. und Matsuoka, Y. (1996): Analysis of heterophilic cell adhesion mediated by CD66b and CD66c using their soluble recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 219, S. 842-7.
- Zheng, P. Y. und Jones, N. L. (2003): *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol*, 5, S. 25-40.
- Zhou, C. J., Liu, B., Zhu, K. X., Zhang, Q. H., Zhang, T. G., Xu, W. H., Wang, H. B., Yu, W. H., Qu, Y. D., Wang, H. J., Wu, H. L., Sun, S. Z. und Guo, J. Q. (2009): The different expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) and possible roles in gastric carcinomas. *Pathol Res Pract*, 205, S. 483-9.
- Zhou, H., Fuks, A., Alcaraz, G., Bolling, T. J. und Stanners, C. P. (1993): Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol*, 122, S. 951-60.
- Zimmermann, W., Ortlieb, B., Friedrich, R. und von Kleist, S. (1987): Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, S. 2960-4.